

Fluoreszenzmikroskopische
Untersuchungen
am fixierten Vaginalausstrich

von

ERNST-JOACHIM HICKL

Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen
Direktor: Professor Dr. R. D y r o f f

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
am fixierten Vaginaausstrich.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Ernst-Joachim H i c k l
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.



Dekan: Professor Dr. C. K o r t h
Referent: Professor Dr. R. D y r o f f
Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1955

Meinen Eltern
und meinem Großvater Prof. L. R. Müller
in Dankbarkeit gewidmet.

I n h a l t .

	Seite
I. Einleitung.....	5
II. Problemstellung.....	6
III. Methodik.....	6
1.) Materialentnahme.....	6
2.) Färbemethodik.....	7
3.) Fluoreszenzeinrichtung.....	7
4.) Versuchsanordnung.....	8
IV. Untersuchungsergebnisse.....	9
1.) Die Eigenfluoreszenz des Vaginalausstrichs....	9
Definition des Begriffes.....	9
Ergebnisse.....	10
2.) Sekundäre Fluoreszenz.....	11
Definition des Begriffes.....	11
Einteilung der Fluorochrome.....	11
a) Der Einfluss der Fixierung.....	12
b) Der Einfluss der Konzentration auf die Fluorochromierung des Vaginalausstrichs.....	13
Der sog. Konzentrationseffekt bei den ver- schiedenen Fluorochromen.....	14
Die Metachromasie.....	18
c) Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fluorochromierung von fixierten Vagi- nalausstrichen.....	24
d) Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des isoelektrischen Punktes von fixierten Vaginal- epithelien.....	28
Methoden.....	28
Ergebnisse.....	31
e) Brauchbarkeit der Fluorochrome.....	32
f) Die Fluoreszenz der einzelnen Zellstrukturen..	35
V. Diskussion.....	36
VI. Zusammenfassung.....	40
VII. Tabellen.....	43
VIII. Literaturverzeichnis.....	55

I. Einleitung.

=====

Seit den grundlegenden Arbeiten von P a p a n i c o l a o u ist die Vaginalcytologie in der klinisch-gynäkologischen Diagnostik immer mehr in den Vordergrund getreten. Die Untersuchung des nach P a p a n i c o l a o u gefärbten Scheidenausstriches sollte heute zu jeder eingehenden gynäkologischen Untersuchung gehören. Da diese Färbung aber doch ziemlich zeitraubend und umständlich ist, taucht die Frage nach einer Methode auf, die bei einfacher Handhabung gute färberische Ergebnisse erzielt. In der F l u o r e s z e n z m i k r o s k o p i e steht uns ein Verfahren zur Verfügung, das hier Anwendung finden kann. Es hat bisher in die vaginalzytologische Diagnostik noch keinen Eingang gefunden. Z i n s e r (1950) bezeichnet es als "zur Zeit noch ohne Bedeutung" und in der neuesten Literatur (S t r e i c h e r u. S a n d k ü h l e r) ist es nicht erwähnt. Lediglich von amerikanischen Autoren (F r i e d m a n n , M e l l o r s , G l a s s m a n n) liegen Berichte vor, nach denen sich diese bei der Erforschung des Genitalkarzinoms erstmals der Methoden der Fluoreszenzmikroskopie bedient haben. Ihr Verfahren ist aber noch recht kompliziert und setzt spezielle Apparaturen voraus, die es für eine Verwendung in grösserem Umfange noch wenig geeignet erscheinen lassen.

Da aber in den Kliniken wie auch bei der Ausstrichkontrolle in der täglichen Praxis solche Verfahren am besten geeignet sind, welche mit dem geringsten Zeitaufwand arbeiten und eine einfache Technik erfordern, lag es nahe, die Möglichkeit der Fluoreszenzmikroskopie in der Vaginalcytologie zu prüfen.

Diese Methode schien zur Untersuchung der Vaginalausstriche besonders geeignet, da zur Beobachtung der Eigenfluoreszenz keine Vorbehandlung notwendig ist, und bei Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen nur niedrige Farbkonzentrationen angewandt werden müssen, sodass die Zellen nur eine geringe Schädigung erfahren.

II. Problemstellung.

An Hand der Untersuchungsergebnisse von etwa 2.500 Scheiden-
ausstrichen wird folgende Fragestellung erörtert:

Eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie zur Beobachtung von
fixierten Vaginalepithelien, und welche Schlüsse lassen sich aus
den gewonnenen Ergebnissen über die Einwirkung der Fluorochrome
ziehen?

Im einzelnen wurde folgendes geprüft:

- 1.) Die Eigenfluoreszenz des Vaginalepithels in Abhängigkeit von
verschiedenen Fixierungsmethoden und das Verhalten bei ver-
schiedenen pH-Werten.
- 2.) Die sekundäre Fluoreszenz des Scheidenepithels bei Anwen-
dung von etwa 50 verschiedenen Fluorochromen.
Insbesondere wurden untersucht:
 - a) der Einfluss der Art der Fixierung des Vaginalausstriches
 - b) der Einfluss der Konzentration der verwendeten Substanzen
 - c) der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die
Fluorochromierung des Vaginalepithels.
 - d) Ferner wurde eine Bestimmung des Isoelektrischen Punktes
der Zellen und der Zellbestandteile mit den Methoden der
Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

III. Methodik.

1.) Materialentnahme:

Das Z e l l m a t e r i a l des Vaginalausstriches wurde,
wie von P a p a n i c o l a o u gefordert, stets aus dem hin-
teren Scheidengewölbe entnommen. Um störende Einflüsse auf die
Untersuchungen weitgehend auszuschalten, wurde darauf geachtet,
dass dem Zeitpunkt der Entnahme in allen Fällen ein völlig be-
handlungsfreier Zeitraum von mindestens 24 Stunden vorausging.

Die Entnahme selbst wurde nach Speculumeinstellung unter
Kontrolle des Auges mit einer Platinöse durchgeführt, um nach
Möglichkeit an derselben Stelle Material abzustreifen, was bei
der grossen Zahl von Abstrichen zur Erzielung vergleichbarer Er-
gebnisse wichtig erschien. Die Entnahme mit der Platinöse wurde

dem Aspirationsverfahren, wie es P a p a n i c o l a o u angibt, vorgezogen, weil damit eine genauere Lokalisation möglich ist.

Das Untersuchungsmaterial wurde unmittelbar nach der Entnahme in das Fixierungsmittel gebracht, um autolytische Zellveränderungen auszuschalten.

2.) Färbemethodik:

Die F ä r b u n g mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte nach dem von H a i t i n g e r , S t r u g g e r u.a. angegebenen Verfahren. Die fixierten und gewässerten Ausstriche wurden mit einer frisch bereiteten Fluorochromlösung überschichtet. Nach genügend langer Einwirkung (in der Regel etwa 3-4 Minuten) wurde die Lösung abgegossen und das Präparat kurze Zeit (1-2 Sekunden) gewässert und getrocknet. Im Gegensatz zur Aufschwemmungsmethode bei der Supravitalfluorochromierung (F u h r m a n n) ist hier das Aufbringen eines Deckgläschens nicht notwendig, oder nur dann, wenn das Präparat für längere Zeit aufbewahrt und vor Staub oder anderen schädigenden Einflüssen geschützt werden soll.

Gewöhnliche Objektträger können hierbei nicht verwendet werden, da beim Mikroskopieren störendes Nebenlicht auftreten kann. Es sind deshalb nur Objektträger aus nicht fluoreszierendem Glas zu benutzen, wie man auch auf das gebräuchliche Immersionsöl zugunsten von reinstem Paraffinöl oder besser von im Handel befindlichem fluoreszenzfreiem Immersionsöl (Firma R e i c h e r t) verzichten muss. Auch Aufhellungsmittel dürfen aus dem gleichen Grunde keine Verwendung finden.

3.) Fluoreszenzeinrichtung:

Während beim normalen Laboratoriumsmikroskop durch Lichtabsorption und -beugung die Struktur des zu betrachtenden Präparates sichtbar gemacht wird, arbeitet das F l u o r e s z e n z - m i k r o s k o p nach einem ganz anderen Prinzip. Hier wird das Präparat selbst zur Lichtquelle, entweder durch seine Eigenfluoreszenz, oder, wenn diese nicht ausreichend ist, durch eine Behandlung mit Fluorochromen. Es ist nur notwendig, das Präparat durch Bestrahlung mit UV-Licht zur Lichtemission anzuregen. Demgemäß ist auch das Ergebnis dieser beiden Methoden vollkommen voneinander verschieden. Beim Hellfeldmikroskop stellt sich das

Präparat dunkel gegen einen hellen Hintergrund dar, bei der Fluoreszenzmikroskopie sind nur die hellleuchtenden Strukturen bei sonst völliger Dunkelheit erkennbar.

Bei unseren Untersuchungen wurde die mit einem gewöhnlichen Leitz-Laboratoriumsmikroskop' kombinierte Fluoreszenzeinrichtung Lux UV der Firma Reichert - Wien verwendet ¹⁾, bei der mit Hilfe des "UV-Passfilters dünn" sowie des "UV-Passfilters dick" aus dem Licht einer Osram-Hochdruck-Quecksilberlampe der Wellenlängenbereich um $350\text{ m}\mu$ ausgeblendet wird. Ein ebenfalls vorgeschaltetes Rotsperfilter mit einer maximalen Durchlässigkeit zwischen 375 und $500\text{ m}\mu$ nimmt die langwellige Strahlung weg, die von dem UV-Passfilter noch durchgelassen wird.

Zur Betrachtung der Präparate muss auf das Okular des Mikroskopes ein Sperrfilter aufgesetzt werden, da die durch restliches Erregerlicht in der Augenkammer angeregte Fluoreszenz den Bildeindruck stören würde. Gleichzeitig dient es dem Schutze der Augen.

Da dieses Filter erst Wellenlängen ab $500\text{ m}\mu$ passieren läßt, ist eine Beobachtung eventuell auftretender Fluoreszenz unterhalb von $500\text{ m}\mu$ nicht möglich.

4.) Versuchsanordnung:

Es wurden folgende Versuche durchgeführt:

- 1.) Zunächst wurde die E i g e n f l u o r e s z e n z der Vaginalepithelien systematisch untersucht und zwar
 - a) in ihrer Abhängigkeit von den verschiedenen Fixationsmethoden und
 - b) ihr Verhalten bei einem veränderten pH-Milieu in Pufferlösungen von pH 1,5 bis pH 11.
- 2.) Ferner wurde die s e k u n d ä r e F l u o r e s z e n z untersucht, d.h. die "Färbung" der Präparate mit verschiedenen Fluorochromen (Fluoreszenzfarbstoffen).

Es wurden etwa 50 verschiedene Fluorochrome erprobt.
Dabei wurde besonders berücksichtigt:

 - a) die Art der Fixierung der zu den Versuchen verwendeten

1) An dieser Stelle sei auch der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft der Dank für die Überlassung der Fluoreszenzeinrichtung ausgesprochen, die die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

Vaginalausstriche.

Hierbei wurden die nach der unten beschriebenen Methode gewonnenen Ausstriche teils an der Luft getrocknet, teils unmittelbar nach ihrer Entnahme in 5 %igem Formalin oder in einem Gemisch von 95 %igem Alkohol und Aether fixiert.

- b) die Konzentration der zur Fluorochromierung verwendeten Substanzen.

Es wurden Verdünnungsreihen hergestellt, die den jeweils untersuchten Farbstoff in einer Konzentration von 1:100, 1:1 000, 1:5 000, 1:10 000, 1:50 000, 1:100 000, 1:500 000 enthielten. Mit diesen wurden die Präparate einheitlich 4 Minuten lang angefärbt, um einen Vergleich der Intensität der Fluorochromierung zu ermöglichen.

- c) der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fluorochromierung des Vaginalausstriches.

Bei konstanter Konzentration (1:10 000) des Fluorochroms wurden Farbstofflösungen hergestellt, deren pH durch Verwendung von Phosphatpuffern zwischen pH 2 und pH 11 lag. Mit diesen wurden die Präparate in der gewohnten Weise fluorochromiert und untersucht.

- d) die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP) der Zellen und Zellbestandteile des Vaginalausstriches.

Dabei wurde die von S t r u g g e r angegebene Acridinorangemethode am fixierten Präparat (Vaginalausstrich) untersucht und ihre Ergebnisse mit denen der bereits vorhandenen Literatur, die nach anderen Verfahren gewonnen wurden, verglichen.

IV. Untersuchungsergebnisse.

=====

1.) Die Eigenfluoreszenz des Vaginalausstrichs.

Definition des Begriffes.

Unter Eigenfluoreszenz versteht man die Tatsache, dass ein Molekül oder ein Molekülverband Strahlungsenergie von einfallendem Licht aufnimmt und diese trägeheitslos in Form von Licht wieder abgibt. Die Wellenlänge der emittierten Strahlung ist dabei ebenso ein charakteristisches Merkmal der Substanz wie die spektrale Absorption. Nach der Regel von Stokes steht die Wellenlän-

ge der ausgesandten Strahlung in einem direkten Verhältnis zu derjenigen des erregenden Lichtes; es müssen die absorbierten Lichtquanten stets kurzwelliger sein als die emittierten. Voraussetzung zur Erzeugung der Fluoreszenz ist, dass sowohl das erregende Licht absorbiert wird, als auch Energiestufen im Molekül vorhanden sind, die zur Emission angeregt werden können.

Aus praktischen Gründen wird, wie in unserem Fall, meist das Gebiet um $350\text{ m}\mu$ mit der sehr starken Hg-Linie bei $366\text{ m}\mu$ zur Anregung benutzt.

Ergebnisse.

Wir konnten durch unsere Untersuchungen feststellen, dass eine Eigenfluoreszenz des Vaginalausstrichs zwar vorhanden, aber zu schwach ist, um Einzelheiten genauer erkennen zu lassen.

Bei der Betrachtung des ungefärbten Präparates im UV-Licht erkennt man eine mattblaue Färbung der Epithelzellen. Die Kerne leuchten etwas heller, und zwar die der Superfizialzellen etwas mehr als die der tiefer liegenden Zellen, sofern diese wegen der geringen Fluoreszenzintensität überhaupt noch sichtbar sind.

Bei Erprobung verschiedener Fixierungsmethoden hat sich ergeben, dass die Eigenfluoreszenz am besten bei Formolfixierung zu beobachten ist und bei Trocken- oder Alkohol-Aetherfixierung geringer wird. Gänzlich ungeeignet für die Beobachtung der Eigenfluoreszenz sind die sonst noch gebräuchlichen Fixierungsmethoden, wie z.B. die Behandlung mit Chromsäure und ihren Salzen, Sublimat, Osmiumsäure oder Pikrinsäure, die alle im Sinne einer Fluoreszenzlöschung auf das Präparat einwirken.

Präparate, die 24 Stunden und darüber in Formol fixiert waren, zeigen eine intensivere Fluoreszenz als diejenigen, deren Fixierungsdauer nur 1 Stunde betrug. Wahrscheinlich handelt es sich bereits um eine sekundäre Fluoreszenz des Formols, das sich auch durch Wässern nicht mehr aus dem Präparat entfernen lässt.

Eine pH-Abhängigkeit der Eigenfluoreszenz konnte nicht beobachtet werden.

2.) Sekundäre Fluoreszenz.

Von ungleich grösserer Bedeutung als die primäre oder Eigenfluoreszenz, die nach dem oben Gesagten in der praktischen Cytologie nur theoretisches Interesse beanspruchen kann, ist das Phänomen der sekundären Fluoreszenz.

Definition des Begriffes.

Wir verstehen darunter die Tatsache, dass ein Körper, der selbst nicht oder nur wenig fluoresziert, mittels einer anderen Substanz im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann, sei es, dass ein stark fluoreszierender Farbstoff rein adsorptiv an diesen Körper angelagert wird, oder dass durch chemische Umsetzungen fluoreszenzfähige Gruppen innerhalb des neuen Moleküls entstehen. Substanzen, die schon in geringer Konzentration solche Eigenschaften besitzen, werden Fluoreszenzfarbstoffe genannt.

Da die meisten Präparate nach der Behandlung mit Fluorochromen bei Betrachtung im gewöhnlichen Licht keine oder nur geringe Farbänderungen aufweisen, sollte man hier nach dem Vorschlag von H a i t i n g e r besser nicht von Fluoreszenz "Farbstoffen" oder "Färbungen", sondern von Fluorochromen und Fluorochromierungen sprechen.

Einteilung der Fluorochrome.

Substanzen, die sich zur Fluorochromierung eignen, gibt es ausserordentlich viele. Einige wenige sind anorganischer, die meisten organischer Herkunft. Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen (S t r u g g e r):

Kathodische Fluorochrome

Anodische Fluorochrome

Neutrale Fluorochrome.

Kathodische Fluorochrome.

Die meisten der gebräuchlichen Fluorochrome gehören zu der k a t h o d i s c h e n Gruppe. Der fluoreszierende Anteil ist hier das elektro-positiv geladene Kation. In der Regel sind diese Fluorochrome in wässriger Lösung weitgehend dissoziiert, jedoch ist diese Dissoziation abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung. Da es sich ja um ein basisches Fluorochrom handelt, ist es um so stärker dissoziiert, je niedriger das pH

der verwendeten Pufferlösung ist, um schliesslich ein Maximum zu erreichen, während andererseits seine Dissoziation um so mehr zurückgeht, je näher das pH am Neutralpunkt liegt, bis es schließlich in undissoziierter Form molekular gelöst vorliegt (s. Kurve nach Strugger).

Teilweise haben die kathodischen Fluorochrome im dissoziierten eine andere Farbe als im undissoziierten Zustand. Diese Art von Substanzen werden als Fluoreszenzindikatoren bezeichnet, die einfarbig und zweifarbig sein können.

Dies deutet darauf hin, dass Eiweissysteme, zu denen ja auch das Material der cytologischen Untersuchung zu zählen ist, oberhalb ihres IEP (wo das Eiweiss eine negative Ladung aufweisen muss) ein Speicherungsmaximum für kathodische Fluorochrome haben.

Anodische Fluorochrome.

Zu einer anderen Gruppe sind die anodischen Fluorochrome zu rechnen, bei denen die fluoreszierende Komponente von den elektronegativen Anionen gebildet wird. Die Dissoziation ist auch hier abhängig vom pH der verwendeten Lösung, und zwar ist sie um so grösser, je weiter es nach der alkalischen Seite verschoben wird, und entsprechend kleiner, je niedriger der pH-Wert wird (s. Kurve). Es ist hieraus verständlich, dass bei Eiweissystemen das Speicherungsmaximum für anodische Fluorochrome unterhalb ihres IEP liegen muss.

Neutrale Fluorochrome.

Von wesentlich geringerer Bedeutung als die beiden oben erwähnten Arten sind die neutralen Fluorochrome, die weder im sauren noch im basischen Teil der pH-Reihe eine nennenswerte Dissoziation aufweisen. Ihre hervorstechendste Eigenschaft ist ihre starke Lipidlöslichkeit.

a) Der Einfluss der Fixierung.

Bei der Durchmusterung von fluorochromierten Ausstrichen, die mit verschiedenen Fixierungsmethoden vorbehandelt wurden, ergab die Trockenfixierung die schlechtesten Resultate, während die mit Formol und Alkohol-Aether fixierten Präparate etwa gleich gut waren. Die Darstellung der Kernstrukturen der Epithelzellen und der Leukozyten war bei der Alkohol-Aether-Fixierung am deutlichsten, während die Zellplasmastrukturen wohl wegen der weniger

intensiven Schrumpfung bei Formol besser zur Geltung kamen. Die Unterschiede sind jedoch nicht sehr gross.

Ferner waren die Ergebnisse der Färbung am besten bei den Ausstrichen, die sogleich nach ihrer Entnahme in noch feuchtem Zustand in die Fixierungsflüssigkeit gebracht wurden, was wir deshalb auch getan haben.

Einige Autoren (F o o t , W e i s s) wollen mit lufttrockenen Präparaten gute Ergebnisse erzielt haben. Nach der überwiegenden Mehrheit der Literaturangaben wird jedoch die feuchte Fixierung vorgezogen (P a p a n i c o l a o u , A y r e , G r a h a m , Z i n s e r). Wir schliessen uns der Meinung an, dass sich die lufttrockenen Präparate schlechter anfärben als die feucht fixierten. Das gilt für die Hellfeldmikroskopie ebenso wie für die Fluoreszenzmikroskopie.

Die Färbeergebnisse werden von der Fixierungsdauer nicht beeinflusst. Gewöhnlich war eine Einwirkung des Fixierungsmittels von 15-20 Minuten ausreichend, aber auch bei einer Dauer von mehreren Stunden wurden keine anderen Resultate erzielt.

b) Der Einfluss der K o n z e n t r a t i o n auf die Fluorochromierung des Vaginalausstriches.

Ein auffallendes Merkmal der Fluorochrome ist ihre Wirksamkeit auch noch in grosser Verdünnung; während bei den gebräuchlichen Hellfeldfarbstoffen bei Konzentrationen von 1:100 000 und darunter eine Färbung nicht mehr möglich ist, ist es uns doch bei vielen Fluorochromen gelungen, die Ausstriche auch bei Verdünnungen von 1:1 Mill. bis 1:10 Mill. ausreichend zu fluorochromieren. Allerdings waren dann sehr lange Einwirkungszeiten notwendig (s. Tabelle 1).

So erhebt sich die Frage, bei welcher Konzentration die besten Fluorochromierungsergebnisse erzielt werden.

Es wurde daher bei Verwendung von über 50 Fluorochromen eine Versuchsreihe geprüft, bei der die Konzentration der Fluorochromlösungen verändert, pH, Fixierung und Fluorochromierungsdauer konstant gehalten wurde.

Der sog. Konzentrationsseffekt bei den verschiedenen Fluorochromen.

Bei seinen umfassenden Forschungen über den Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange stiess Strugger erstmalig auf eine Erscheinung, die er als Konzentrationsseffekt bezeichnete.

Stellte er nämlich Verdünnungen dieses Stoffes von 1:100 000 bis 1:100 her, so ergab sich die eigenartige Tatsache, dass bei Betrachtung dieser Lösungen in ultraviolettem Licht die Farbe nicht allmählich intensiver wurde, sondern sich änderte. Fluoreszierte die Lösung in der starken Verdünnung noch deutlich laubgrün, so schlug diese Farbe bei einer Konzentration von 1:1 000 in ein deutliches Gelb um, um schliesslich bei einer Verdünnung von 1:100 kupferrot aufzuleuchten. Das Spektrum der Fluoreszenzerscheinungen verschiebt sich also bei steigender Konzentration immer mehr in den langwelligen Bereich.

Charakteristisch für diesen Konzentrationseffekt ist ausserdem noch die Tatsache, dass er nur dann auftritt, wenn das Acridinorange in dissoziierter Form vorliegt, bei einer Wasserstoffionenkonzentration von pH 9 und mehr ist bei einer Konzentrationsreihe keine Änderung der Fluoreszenzfarbe mehr zu beobachten.

Die physikalische oder chemische Ursache dieser Erscheinung ist noch nicht geklärt, Strugger selbst hält eine Beziehung dieses Effektes mit der reversiblen Polymerisation von Pseudoisocyaninen, wie sie von Scheibe beobachtet wurde, für möglich.

Die Frage, ob und in welchem Bereich des Spektrums auch bei den anderen Fluorochromen ein Konzentrationseffekt besteht und wie er sichtbar wird, wurde am Vaginalepithel in Verdünnungsreihen von 1:100 bis 1:500 000 untersucht.

Es war zu klären, ob diese Erscheinung nur beim Acridinorange auftritt, oder ob auch andere Stoffe, die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden, ein ähnliches Verhalten aufweisen.

Bei diesen Versuchen wurde folgendermassen vorgegangen:

Die auf verschiedene Weise fixierten Vaginaausstriche (Trocken, Formol, Alkohol-Aether $\overline{\text{AA}}$) wurden jeweils mit Fluorochromlösungen in einem Konzentrationsbereich von 1:100 bis

1:500 000 bei pH 7 fluorochromiert, wobei die Einwirkungszeit, um vergleichbare Werte hinsichtlich der Intensität zu erzielen, konstant gehalten wurde. Die so erhaltenen Präparate wurden gleich nach dem Trocknen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Als Konzentrationseffekt gewertet wurden nur Erscheinungen, bei denen eine deutliche Änderung der Fluoreszenzfarbe, also ein einwandfreier Umschlag zu bemerken war. Verschiebungen der Farbskala von nur geringem Ausmass wurden nicht berücksichtigt, da diese innerhalb der Fehlerbreite der Methode liegen können. So ist es z.B. nicht als ein Konzentrationseffekt aufzufassen, wenn die Fluoreszenzfarbe im Laufe der Verdünnung etwas heller wird (z.B. B e r b e r i n s u l f a t : Gelbgrün → hell Gelbgrün). - Nur etwa 16 von den untersuchten Fluorochromen zeigen einen deutlich erkennbaren Konzentrationseffekt.

Man kann diese Substanzen nach ihren Eigenschaften in verschiedene Gruppen einteilen, und zwar nach der Stärke der Fluoreszenz, der Deutlichkeit des Farbunterschiedes bei Veränderung der Konzentration und nach der Übereinstimmung im Farbton. Eine Sonderstellung nimmt auch hier wegen seiner Stärke und Deutlichkeit das A c r i d i n o r a n g e ein, dessen Eigenschaften bereits bei Strugger eingehend behandelt worden sind.

Betrachtet man nun systematisch die einzelnen Farberscheinungen der Fluorochrome bei den verschiedenen Zellstrukturen und setzt sie in Beziehung zu einander, so kommt man zu folgenden Ergebnissen:

Unter der Zahl der Fluorochrome, die einen deutlich erkennbaren Konzentrationseffekt aufweisen, fällt zunächst eine Reihe von Substanzen auf, die in ihren Eigenschaften weitgehend übereinstimmen. Es ist dies die Gruppe der " P h o s p h i n " - Fluorochrome, nämlich das A u r o p h o s p h i n , das B r i l l a n t p h o s p h i n , das C o r i p h o s p h i n und das D i a m a n t p h o s p h i n . Ausserdem passt in diese Gruppe wegen seiner Farbeeigenschaften noch das A c r i d i n .

Diese Fluorochrome zeigen in starker Verdünnung das Phänomen der Grünfluoreszenz, die sich bei Erhöhung der Konzentration über Gelbgrün in Gelb ändert.

Die Zellstrukturen sind nicht gleichmässig tingiert, vielmehr erscheint das Cytoplasma, sowohl der oberflächlichen als

auch der tieferliegenden Zellen des Vaginalepithels (Ausnahme Coriphosphin) in einer moosgrünen Fluoreszenz, die bei einer Konzentration von 1:100 bis 1:1 000 am deutlichsten ist, bei 1:10 000 hellgrün und bei noch stärkerer Verdünnung blaugrün wird, und diese Färbung auch bis in die stärksten Verdünnungen hinein beibehält.

Ein anderes Verhalten zeigen die Kerne, sowohl die der Epithelzellen als auch die der Leukozyten: bei einer Konzentration von 1:100 und 1:1 000 zeigen sie eine eindrucksvolle leuchtend gelbe (Vaginalepithelien), bzw. leuchtend gelb-orange (Leukozyten) Fluoreszenz. Diese verändert sich bei 1:5 000 bis 1:10 000 allmählich ins Grüngelbe, um bei einer Konzentration von 1:50 000 und darüber einheitlich blaugrün zu werden.

Die Fluorochrome dieser Gruppe zeigen auch sonst noch gemeinsame Eigenschaften, z.B. gehört ihre Intensität mit Ausnahme des Acridin, das etwas schwächer ist, einheitlich zu der mit drei Kreuzen bezeichneten Gruppe unserer Intensitätsskala. Sie gehören alle zur Gruppe der kathodischen Farbstoffe, sind also auch in chemophysikalischer Hinsicht miteinander verwandt.

Ein sehr ähnliches Verhalten wie diese Gruppe von Fluorochromen weisen drei andere Substanzen auf, bei denen der Farbunterschied aber schon nicht mehr in solch auffälliger Klarheit hervortritt. Es sind dies das *Auracin*, das *Auramin* und das *Euchrysin GG NX*.

Bei diesen ist das Cytoplasma nicht mehr von einem so deutlichen satten Grün wie bei der Phosphingruppe, sondern weist einen mehr laubgrünen Farbton auf, der Umschlag nach blaugrün erfolgt aber ebenso bei 1:10 000 bis 1:50 000.

Die Fluoreszenzänderung der Kerne der Vaginalepithelien und der Leukozyten unterscheidet sich wenig von der der ersten Gruppe. Die Konzentrationen, bei denen der Umschlag auftritt, sind die gleichen, nur ist das Gelb bzw. das Orangelb nicht mehr so leuchtend wie dort, sondern bekommt mehr einen grünen Einschlag, weniger ausgeprägt beim Euchrysin, deutlicher bei den beiden anderen Fluorochromen.

Den Abschluss in der Reihe der untersuchten Fluorochrome, die einen erkennbaren Konzentrationseffekt mit einer guten Fluoreszenzintensität verbinden, bildet das *Brilliantdianilgrün*, das in Verdünnungen von 1:100 und 1:1 000 im

Cytoplasma der Vaginalepithelien eine mattgrüne Fluoreszenz aufweist, die bei stärkerer Verdünnung blaugrün wird, während die Kerne von Epithelzellen und Leukozyten von gelblich grün, bzw. mehr türkis nach hellblau umschlagen.

Es schliessen sich nun eine ganze Reihe von Substanzen an, die zwar noch einen Konzentrationseffekt aufweisen, der aber teils wegen des geringen Farbunterschiedes, meist aber wegen der zu wenig grossen Intensität der Fluoreszenzfarben nicht gut zur Geltung kommt, sodass sie für eine genauere Erforschung, zum mindesten mit einer UV-Einrichtung, wie sie uns zur Verfügung stand, nicht mehr geeignet erscheinen.

Auffällig und zu erwähnen wäre in dieser Reihe etwa noch das R h e o n i n , das einen Übergang von Gelbbraun (Konzentration 1:100, 1:1 000) zu Zartgrün im Cytoplasma der Vaginalepithelien, von Orangegelb zu leuchtend Grün im Kern von Epithelien und Leukozyten aufweist.

Nähere Einzelheiten über die Gesamtheit der Fluorochrome, bei denen ein Konzentrationseffekt beobachtet werden konnte, sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen.

Eine auffällige Erscheinung bei den Konzentrationseffekten besteht ausserdem darin, dass die besten Fluorochrome wie etwa Berberinsulfat, Chroma-Primulin und Thioflavin S keinen oder nur einen ganz unbedeutenden derartigen Effekt aufweisen. Ausserdem erscheint es bemerkenswert, dass die kathodischen Fluorochrome in dieser Hinsicht besonders deutlich reagieren.

Bezüglich des Farbumschlages, der beim Konzentrationseffekt zu beobachten ist, liess sich bei einer Kontrolle der sämtlichen Fluorochrome, die einen derartigen Effekt aufweisen, klar feststellen, dass dem Umschlag bei allen Substanzen eine gemeinsame Regel zu Grunde liegt, nämlich, dass sich die Fluoreszenzfarbe stets parallel mit dem Steigen der Verdünnung in Richtung der kürzeren Wellenlänge verschiebt, also entweder Orange nach Gelb oder Gelb nach Grün bzw. nach Blau.

Von dieser Regel konnte keine Ausnahme festgestellt werden.

Die Metachromasie.

Haben wir uns bei der Beobachtung des Konzentrationseffektes ausschliesslich mit der Farbänderung der Fluoreszenz beschäftigt, wie sie uns bei der Variation der Konzentration auffällt, so bleibt uns noch ein anderes Gebiet zur Betrachtung übrig, das als **M e t a c h r o m a s i e** bezeichnet wird.

Unter Metachromasie versteht man die Tatsache, dass sich die einzelnen Bestandteile eines Präparates (Epithelzellen, Leukozyten, Döderleinsche Stäbchen etc.) oder auch verschiedene Strukturanteile der Zellen, wie Kern, Plasma, Einschlusskörperchen etc. bei Anwendung eines geeigneten Fluorochroms verschieden anfärben.

Es kann also mit **e i n e m** Fluorochrom ein zwei- oder sogar mehrfarbiges Bild entstehen, wie es bei der Hellfeldmikroskopie nur bei der Anwendung von mindestens zwei Farbstoffen möglich ist.

Bei Betrachtung der Präparate im UV-Licht leuchten die verschiedenen Zellen in verschiedenen Fluoreszenzfarben auf. Die Vaginalepithelien sind anders gefärbt als die Döderleinschen Stäbchen, während die Leukozyten einen anderen Farbton oder eine verschiedene Farbe aufweisen können.

Ausserdem sind in der Regel Kern und Plasma durch verschiedene Intensität des ausgesandten Fluoreszenzlichtes unterschieden. Auch können in den Zellen selbst die einzelnen Zellelemente wie Kern und Plasma in verschiedenen Farben bzw. Farbtönen fluoreszieren.

Dieses Phänomen zeigt sich hauptsächlich an den Zellen des Vaginalepithels, es ist bei den Leukozyten nicht so ausgeprägt. Ausserdem kann man feststellen, dass sich das Plasma dieser Zellen in verschiedenen Farben darstellt. Manchmal ist auch eine Beziehung zwischen der Färbung und der Herkunft der Zellen herzustellen, dergestalt, dass die Superfizialzellen in einer anderen Farbe fluoreszieren als die Basalzellen.

Versucht man, die Metachromasie nach ihrer Deutlichkeit zu unterteilen, so findet man unter den Fluorochromen, die eine ausgeprägte und gut unterschiedene Metachromasie zeigen, an erster Stelle die schon oben erwähnte "Phosphin"-Gruppe.

Bei dieser Gruppe, zu der **A c r i d i n**, **A u r o -**

phosphin, Brillantphosphin, Coriphosphin¹⁾ und Diamantphosphin gehören, waren die Farbunterschiede bei Konzentrationen von 1:1 000 bis 1:5 000 am besten zu beobachten.

Über die Metachromasie des Acridinorange, das auch in diese Gruppe gehört, finden sich ausführliche Angaben bei Strugger.

Die einzelnen Zellelemente des Präparates stellen sich nach einer Fluorochromierung von 4 Minuten Dauer folgendermassen dar:

Das Cytoplasma der Vaginalepithelien leuchtet in satten Moosgrün, während sich die Kerne dieser Zellen von diesem grünen Untergrund als leuchtend gelbgefärbte Strukturen abheben.

Bei den Leukozyten ist das Plasma ebenfalls grün gefärbt, da aber bei diesen Zellen die Kernplasmarelation zugunsten des Kernes verschoben ist, überstrahlt der stärker leuchtende Kern dieses Grün, so dass es erst bei stärkerer Vergrösserung zu sehen ist. Der Kern der Leukozyten, der besonders hervortritt, ist von einer leuchtend orangegelben Fluoreszenz. Hinzu kommt noch die Tatsache, dass die Döderleinschen Stäbchen in einem deutlichen Orange aufleuchten, es entsteht also bei Verwendung dieser Fluorochrome ein überaus eindrucksvolles Bild.

Eine etwas weniger hervorstechende, aber immer noch gute Metachromasie zeigt sich bei den Substanzen E u c h r y s i n G G N X , A u r a c i n und A u r a m i n .

Bei Konzentrationen von 1:1 000 bis 1:5 000 stellt sich das Cytoplasma der Vaginalepithelien laubgrün (bei A u r a - m i n mehr hellgrün) dar. Die Kerne leuchten gelb (bei A u - r a m i n mehr grüngelb), während die Kerne der Leukozyten (bei grünlichem Protoplasma) orangegelb bzw. grüngelb fluoreszieren und die Döderleinschen Stäbchen eine Gelborangefärbung (A u r a c i n : Gelb) zeigen.

Schliesslich gehört hierher noch das B r i l l a n t - d i a n i l g r ü n , bei dem das Cytoplasma der Vaginalzellen matt grünblau fluoresziert, während die Kerne leuchtend blau-grün, die Leukozyten im Plasma grünlich, im Kern türkisfarben imponieren.

Ausserdem sind hier noch zu erwähnen das D i m e t h y l -

1) Über C o r i p h o s p h i n siehe auch weiter unten.

a m i n o a z o b e n z o l , das b a s i s c h e F u c h -
s i n , das O r c e i n und das R h e o n i n , die zwar alle
eine Metachromasie zeigen, aber wegen der relativ geringen In-
tensität der Fluoreszenz für Untersuchungen nicht mehr in Frage
kommen.

Eine Übersicht über diese Fluorochrome gibt die Tabelle 3.

Eine Sonderstellung nehmen das T h i o f l a v i n S
und die P r i m u l i n e ein, die wegen ihrer besonderen fär-
berischen Eigenschaften zusammen mit einigen anderen hierher ge-
hörigen Fluorochromen im folgenden gesondert besprochen werden
sollen.

In diese Gruppe gehören das T h i o f l a v i n S, das
C h r o m a - P r i m u l i n und das P r i m u l i n O.

Betrachtet man Präparate, die mit einer von diesen Substan-
zen fluorochromiert worden sind, so erhält man folgendes Bild:

Die Zellen des Vaginalepithels besitzen ein teils leuch-
tend hellblaues, teils türkisfarbenes, teils gelbliches Cytoplas-
ma, während der Kern sich weniger in der Farbe hervorhebt, dafür
aber heller leuchtet als das Protoplasma der jeweiligen Zelle,
bei den blauen Zellen bläulich weiss, bei den gelblich gefärb-
ten in einem gelblichen Ton.

In grossen Untersuchungsreihen liess sich feststellen, dass
die Farbänderung von Gelblich nach Blau etwa in Parallele zu
setzen ist mit den Entwicklungsstadien der Zellen in der Vagi-
nalschleimhaut.

Die tieferen - basalen und parabasalen - Zellen fluoreszie-
ren überwiegend gelblich, die intermediären und superfizialen
Zellen lassen in ihrem Plasma einen Übergang von Türkis nach
Blau erkennen.

Döderlein'sche Stäbchen haben sich bei der Fluorochromie-
rung mit diesen Fluorochromen nicht einwandfrei feststellen las-
sen.

Wegen ihrer verwandten Eigenschaften lassen sich noch das
G e r a n i n und das T h i a z i n r o t zu einer Untergrup-
pe zusammenfassen. Hier fluoreszieren die Zellen des Vaginal-
epithels teils blau mit blauem Kern, teils rot mit rotem Kern.
Eine Beziehung zwischen der Färbung und der Herkunft aus den ver-
schiedenen Schichten der Vaginalschleimhaut konnte nicht festge-

stellt werden.

Ähnliches gilt für das P y r o n i n , bei dem teils gelbliche, teils grünliche Zellen mit entsprechenden Kernen gefunden wurden, über deren Herkunft aber ebenfalls keine Aussagen gemacht werden können.

Schliesslich seien noch das C o r i p h o s p h i n und das R i v a n o l erwähnt, die ein ähnliches Verhalten aufweisen.

Man kann bei diesen beiden Fluorochromen beobachten, dass ein Teil der Zellen gelbgrün fluoresziert und einen gelblich getönten Kern zeigt, während andere Zellen blaugrün mit entsprechend leuchtendem Kern erscheinen. Offenbar fluoreszieren die Zellen der tieferen Schichten der Vaginalschleimhaut mehr gelblich, die oberflächlicheren Zellen mehr blaugrün; diese Befunde sind jedoch nicht völlig gesichert.

Es sei noch ein weiterer, etwas auffälliger Befund erwähnt:

Bei C o r i p h o s p h i n zeigen sich in dem gelb fluoreszierenden Plasma stärker leuchtende, stäbchenförmige Körper. Wahrscheinlich handelt es sich um die Darstellung von Mitochondrien.

Überblickt man nun die Ergebnisse unserer Konzentrationsversuche kritisch und versucht man, sie mit der Metachromasie in Beziehung zu bringen, so fällt auf, dass sowohl der Konzentrationseffekt als auch die Metachromasie durch die gleichen Fluorochrome hervorgerufen werden, und dass auch die Farbeffekte bei beiden Erscheinungen häufig dieselben sind.

Dies ist besonders deutlich bei der sogenannten Phosphin-Gruppe. Bei dem Konzentrationseffekt wie auch bei der Metachromasie ergab sich ein Farbübergang von Grün über Gelbgrün nach Goldgelb. Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass beiden Vorgängen, die bisher in der Literatur immer getrennt aufgeführt wurden, eine einheitliche chemisch-physikalische Ursache zugrunde liegt.

Es wäre möglich, dass es sich auch bei der Metachromasie um einen Konzentrationseffekt handelt, bei dem das Fluorochrom durch Kern und Plasma in unterschiedlicher Konzentration gespeichert wird.

Aus der Hellfeldmikroskopie ist es bekannt, dass die Kerne

in der Regel eine grössere Affinität zu dem verwendeten Farbstoff haben als das Protoplasma. Auch unter den Kernen werden Unterschiede beobachtet, dergestalt, dass lockere Kerne weniger Farbstoff zu speichern vermögen als kompaktere.

In der Fluoreszenzmikroskopie dürften ähnliche Verhältnisse bestehen - eine Anzahl von Fluorochromen sind auch als Diachrome bekannt - auch hier wird der Kern wesentlich mehr fluoreszierende Substanz aufnehmen als das Plasma.

Eine Bestätigung dieser Vermutung finden wir bei der Fluorochromierung von Zellen mit Fluorochromen der "Phosphin"-Gruppe, z.B. dem *B r i l l a n t p h o s p h i n*, das in geringer Konzentration grün, in stärkerer goldgelb fluoresziert. Nach den obigen Feststellungen wäre zu erwarten, dass das Cytoplasma als derjenige Strukturbestandteil, der am geringsten speichert, grün erscheint, während die Kerne von Vaginalepithel und Leukozyten wegen ihrer starken Speicherefähigkeit goldgelb aufleuchten. Ein Blick auf Tabelle 3 bestätigt diese Erwartungen.

Auch bei anderen Fluorochromen, die nicht zur Reihe der Phosphine gehören, kann man ein ähnliches Verhalten beobachten.

Aus diesen Befunden lässt sich die Regel ableiten, dass jedes Fluorochrom, das einen Konzentrationseffekt besitzt, auch eine Metachromasie zeigt, was aus einem Vergleich der Tabellen 2 und 3 hervorgeht.

Zusammenfassend kann man sagen:

- 1.) Fluorochrome, die einen *K o n z e n t r a t i o n s e f f e k t* bieten, zeigen auch das Phänomen der *M e t a c h r o m a s i e* (Ausnahmen s.u.).
- 2.) Die *M e t a c h r o m a s i e* tritt nur bei relativ grossen Fluorochromkonzentrationen bzw. langen Einwirkungszeiten auf. Bei stärkeren Verdünnungen ist die Konzentration offenbar nicht mehr gross genug, um den Strukturen eine maximale Speicherung zu ermöglichen.
- 3.) Der Farbumschlag bei *K o n z e n t r a t i o n s e f f e k t* und *M e t a c h r o m a s i e* erfolgt stets im gleichen Farbbereich, und zwar lässt sich ausserdem noch die Regel beobachten, dass die Wellenlänge der Farbe parallel mit der Konzentration abnimmt.

In dieses System scheint eine Gruppe von Fluorochromen nicht hineinzupassen, und zwar diejenige, die das Thioflavin S, das Chroma-Primulin und das Primulin O als wichtigste Glieder enthält. Sie weisen bei Konzentrationsversuchen keinen besonderen Effekt auf und verfügen doch über eine ausgeprägte Metachromasie (s.o.).

Auch hierfür liess sich eine Erklärung finden:

Aufschluss gibt hier die Forschung über das Altern der Zelle, denn um einen solchen Vorgang handelt es sich ja beim Wandern der Zellen der Vaginalschleimhaut von der basalen Schicht zur Oberfläche.

R u ž i č k a und seine Schule haben beim Altern der Zelle einige grundlegende Beobachtungen gemacht, die hier für unsere Untersuchungen wesentlich sind:

Sie wiesen auf kolloidchemische Zustandsänderungen im Protoplasma der Zellen während des Alterungsvorganges hin. So wie viele kolloide Lösungen sich im Laufe der Zeit verändern und bei der Synärese Wasser abscheiden, so sollen auch die plasmatischen Kolloide sich allmählich unter Wasserverlust verdichten, wobei gleichzeitig eine Herabsetzung der elektrischen Ladung erfolgt (Letzteres wurde durch Untersuchungen von P i s c h i n g e r und Z e i g e r bestätigt).

R u ž i č k a bezeichnete diese Erscheinung als P r o t o - p l a s m a h y s t e r e s i s und begründete sie mit dem Entropiesatz, wonach der labilere Zustand der kolloidalen Verteilung in den stabileren der Ausflockung mit seiner geringeren Oberflächenentfaltung übergehen soll.

S t r u g g e r sowie B r u n s und B e e r h a l t e r führten Untersuchungen an Primulin und Thioflavin S durch, wobei sie zu folgenden Ergebnissen gelangten:

S t r u g g e r liess Primulin in eine 10 %ige Gelatinesäule eindiffundieren und beobachtete hierbei eine deutliche Phasentrennung; eine schneller diffundierende ultramarinblaue Fluoreszenzkomponente eilte einer langsamer diffundierenden gelben voraus. Ausserdem stellte er fest, dass sich diese Polydispersität an organischen Strukturen dadurch zeigt, dass feinporige Systeme sich nur ultramarinblau, grobporige aber auch gelb fluorochromieren lassen.

B r u n s und B e e r h a l t e r , die das Thioflavin S mit den Methoden der Kapillaranalyse, der Elektrophorese und der UV-Spektrographie untersuchten, kamen zu dem Ergebnis, dass es sich bei diesem Fluorochrom um drei selbständige Fluoreszenzkomponenten handle, von denen zwei blau und eine gelb fluoreszieren. Bei Gelatinemodellversuchen stellte sich ebenfalls heraus, dass eine schneller diffundierende blaue einer langsameren gelben Komponente vorausseilt.

Aus diesen beiden Beobachtungen erklärt sich nun die unterschiedliche Fluoreszenzfärbung der einzelnen Epithelzellen recht einleuchtend. Die verdichteten oberflächlichen Zellen färben sich wegen ihrer feineren Poren blau, während die Zellen aus tieferen Schichten sich wegen der noch nicht eingetretenen Protoplasmahysteresis gelb fluorochromieren lassen.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch die pH-Änderung während des Alterns der Zelle bei diesen Erscheinungen eine Rolle spielt, aber auch so scheint die Metachromasie hier eine ausreichende Erklärung gefunden zu haben.

c) In einer anderen grossen Reihe von Versuchen sollte der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fluorochromierung von fixierten Vaginalausstrichen festgestellt werden.

Schon E i s e n b r a n d und D h é r é haben bei einigen Fluorochromen eine Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbe vom pH bemerkt und beschrieben, z.B. bei der Salizylsäure, ebenso erwähnt H a i t i n g e r den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fluorochromierung; diese Frage wurde besonders von S t r u g g e r genauer untersucht und geklärt.

Lässt man Fluorochrome in Lösungen von verschiedenem pH auf fixierte Ausstriche einwirken, so unterscheiden sich die Ergebnisse der Fluorochromierung meist recht deutlich voneinander. Es tritt bei Veränderung des pH-Wertes eine Intensitätsänderung und ein Farbumschlag auf.

Bezüglich der Intensitätsänderung durch das pH lässt sich eine Einteilung nach den verschiedenen Gruppen von Fluorochromen (kathodisch, anodisch und elektroneutral) treffen.

Bei den kathodischen Fluorochromen ist die Intensität in den niederen pH-Bereichen ziemlich gering. Nach Überschreiten einer bestimmten Grenze wird sie plötzlich stärker, um bei noch höherem pH schliesslich wieder abzunehmen.

Diese Erscheinung kann durch die folgenden Tatsachen erklärt werden:

Die Intensität der Fluorochromierung ist abhängig

- 1.) vom Dissoziationsgrad des betreffenden Fluorochroms und
- 2.) von der Lage des isoelektrischen Punktes des zu untersuchenden Eiweisskörpers.

Die geringe Wirksamkeit der kathodischen Fluorochrome in den niedrigen pH-Bereichen überrascht zunächst, denn sie sind im sauren Bereich maximal dissoziiert und müssten deshalb zur Fluorochromierung sehr gut geeignet sein.

Die geringe Anfärbung im sauren Bereich erklärt sich aber dadurch, dass unterhalb des IEP das Eiweiss der Zellen auf Grund seiner amphoteren Eigenschaft positiv geladen ist, und infolgedessen die ebenfalls positiv geladenen Fluoreszenzkationen nicht zu binden vermag. Erst nach Überschreiten des IEP zeigt sich dann eine maximale Fluorochromierung. Das Geringerwerden der Fluoreszenzintensität in den höheren pH-Bereichen erklärt sich durch den Rückgang der Dissoziation, wodurch schliesslich keine Ionen mehr vorhanden sind und die Substanz molekular gelöst ist.

Als Beispiel möge hier das Verhalten der Zellen bei Fluorochromierung mit *B r i l l a n t p h o s p h i n* dienen (s. Tabelle 4).

Es fällt auf, dass hier nach dem Aufhören der Dissoziation im schwach sauren bzw. alkalischen Bereich die Mitochondrien besonders deutlich grün gefärbt hervortreten, während die anderen Anteile des Präparates kaum gefärbt sind. Dies kommt daher, dass die molekular gelösten Fluorochromlösungen eine besondere Affinität zu den Lipoiden zeigen. *S t r u g g e r* hat die Lipidlöslichkeit als eine allgemeine Eigenschaft der kathodischen Fluorochrome bezeichnet.

Bei den anodischen Fluorochromen sind die umgekehrten Verhältnisse zu beobachten.

Die Eiweisskörper binden unterhalb ihres IEP, wo sie elektropositiv geladen sind, die elektronegativ geladenen Fluores-

zenanionen sehr stark, während oberhalb des IEP keine elektrostatische Bindung mehr auftreten kann.

Bei ihnen tritt also unterhalb des isoelektrischen Punktes eine stärkere Anfärbung der Zellen auf.

Als Beispiel hierzu möge das F l u o r e s c e i n - N a dienen (s. Tabelle 4).

Bei den elektroneutralen Fluorochromen, die also weder kathodisch noch anodisch sind, lässt sich keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Wasserstoffionenkonzentration feststellen.

Als Beispiel kann das S u l f o r h o d a m i n B angeführt werden (s. Tabelle 4).

Bei unseren Versuchen über den Einfluss der Fluorochromlösung auf die Fluorochromierung der fixierten Ausstriche wurde folgendermassen vorgegangen:

Als Puffersystem wurde das Phosphatpuffergemisch, wie es S t r u g g e r angegeben hat, verwendet. Die auf die oben angegebene Weise fixierten Präparate wurden in einer gepufferten Fluorochromlösung von einer Konzentration von 1:10 000 in 10 Stufen von pH 2 bis pH 11 etwa 5 Minuten fluorchromiert. Danach wurde die Lösung abgossen und das Präparat mit einem Puffer von demselben pH abgespült. Nach dem Trocknen wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Es wurde darauf geachtet, dass möglichst frische Puffer verwendet wurden; das pH wurde mit dem pH-Messgerät von P h i l i p s eingestellt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 5 dargestellt. In diese wurden nur Fluorochrome aufgenommen, die eine nennenswerte Intensität aufweisen.

Allgemein fällt hierbei auf, dass bei den k a t h o d i s c h e n Fluorochromen der Punkt oder besser die Zone, bei der die Intensität und oft die Fluoreszenzfarbe wechseln, ziemlich konstant etwa zwischen pH 4,8 und 5,8 liegt. Diese Werte liegen tiefer als diejenigen, die S t r u g g e r und D e n z l e r an fixierten Bakterienausstrichpräparaten erzielen konnten (z.B. für Sarcina lutea bei pH 3,46).

Daraus ist zu schliessen, dass der IEP der fixierten Vaginalepithelien höher liegt als der der Bakterien, da der Farbum-

schlag bei den Vaginalzellen bei einem höheren pH erfolgt.

Bei systematischer Durchmusterung der Ausstriche fiel außerdem auf, dass der Farbumschlag und die Intensitätsänderung bei den Zellen aus den tieferen Epithellagen der Vaginalschleimhaut bei einem etwas niedrigeren pH erfolgte als bei den Zellen der oberen Epithelschichten.

Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass der IEP der untersten Zellen weiter im sauren pH-Bereich liegt als derjenige der mehr oberflächlich gelegenen Zellen.

A n o d i s c h e Fluorochrome, wie das C h r o m a - P r i m u l i n oder das F l u o r e s c e i n - N a zeigen eine andere Reaktion.

Der Umschlagspunkt ist bei den anodischen Fluorochromen von stärkerer zu schwächerer Intensität bei pH 5,5 bis pH 6,5 gelegen.

Ein Unterschied in der Reaktion von oberflächlicheren und tiefer gelegenen Zellen konnte hier nicht beobachtet werden.

Bei kathodischen und anodischen Fluorochromen war auch ein Farb- und Intensitätsumschlag der einzelnen Zellen bzw. Zellbestandteile des Präparates zu bemerken, z.B. tritt der Umschlag der Leukozytenkerne bei den kathodischen Fluorochromen stets eher ein als bei dem Protoplasma der Epithelzellen.

Diese Befunde werden im nächsten Abschnitt über die Bestimmung des isoelektrischen Punktes noch eingehend besprochen werden.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die kathodischen Fluorochrome für die Anfärbung und Betrachtung von fixierten Vaginaausstrichen weitaus am geeignetsten sind. Diese sind auf Grund der Lage des IEP der Zellen in einem weit grösseren Bereich wirksam als die anodischen Fluorochrome, ausserdem liefern sie bei einem pH, wie er in gewöhnlichem Wasser zu finden ist, sehr gute und brauchbare Fluorochromierungsergebnisse.

Bei den e l e k t r o n e u t r a l e n Fluorochromen war in der pH-Reihe keine Änderung der Farbe oder der Intensität festzustellen.

d) Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des isoelektrischen Punktes von fixierten Vaginalepithelien.

Die Bestimmung des IEP von histologischen Strukturen hat immer mehr an Bedeutung gewonnen. P i s c h i n g e r entwickelte als erster eine Methode zur Festlegung des IEP. Er ging von der Tatsache aus, dass die Kolloidsysteme, als die man die Zellen des menschlichen Organismus auffassen kann, bei einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration - eben dem IEP - ihre elektrische Ladung verlieren. Es besteht zwischen den Kolloidteilchen und dem Dispersionsmittel keine Potentialdifferenz mehr, sie flocken in diesem Stadium besonders leicht aus, zeigen ein Minimum an Quellung, Viskosität und dgl. mehr.

Wird nun das pH des Mediums, ausgehend von dem pH, bei dem diese Erscheinungen auftreten, nach oben bzw. unten verschoben, so reagieren diese Eiweiss-Systeme auf Grund ihrer amphoteren Eigenschaften jeweils entgegengesetzt, zeigen also bei steigendem pH eine vermehrte Abdissociation von H-Ionen, bei fallendem von OH-Ionen.

P i s c h i n g e r hat nun diese Erscheinungen zur Bestimmung des IEP verwendet, indem er einen basischen und einen sauren Farbstoff als pH-Medium benutzte. Oberhalb des IEP musste das saure Cyanol stärker gespeichert werden, während das basische Toluidinblau kaum ein Farbergebnis zeigte; unterhalb desselben war das Resultat umgekehrt. Er stellte fest, dass bei maximaler Adsorption die 100 bis 200 fache Farbstoffmenge gebunden wurde als bei minimaler. Eine Fehlerquelle, die es bei diesem Verfahren zu vermeiden gilt, ist der Umstand, dass nur reine Elektrolytfarbstoffe verwendet werden dürfen, die in Pufferlösungen nicht selber einen IEP bilden dürfen.

Nach dieser von P i s c h i n g e r angegebenen Methode liegt also der IEP der untersuchten Strukturen in dem pH-Bereich, bei dem die geringste Adsorption beider Farbstoffe festzustellen ist.

Die ersten Untersuchungen über die Umladungsbereiche von verhornenden Epithelzellen wurden von Z e i g e r an dem Epithel der Haut des Hutaffen vorgenommen. Er fand Werte, die sich entsprechend der Herkunft aus den tieferen bis zu den höheren Zellschichten zwischen pH 3 bis etwa pH 8 bewegten. Diese Unter-

suchungen wurden mit einem Farbstoffpaar von m/200 Methylenblau und m/200 Ponceau vorgenommen, und zwar an formolfixierten Schnitten.

Der IEP des Vaginalepithels wurde erst in neuester Zeit von S c h l i e f untersucht.

Er bestimmte bei den Ausstrichen, die er jeweils zu bestimmten Zeitpunkten des Zyklus entnahm, den mittleren Wert des Umladungsbereiches. Ausserdem verglich er seine Werte gleichzeitig mit denen von Präparaten, die in der herkömmlichen Weise nach P a p a n i c o l a o u gefärbt worden waren.

Er fand eine deutliche Übereinstimmung der Veränderungen, wie sie bei beiden Verfahren im Laufe des Zyklus auftraten, dergestalt, dass in den Ausstrichen, bei denen die acidophilen Zellen überwiegen, der IEP zwischen 5, 6 und 6,0 lag, während bei einem Übergewicht der basophilen Zellen der mittlere Umladungsbereich zwischen pH 4,6 und 5,0 gefunden wurde.

Ausstriche, bei denen sich acidophile und basophile Zellen ungefähr die Waage halten, ergaben einen mittleren Wert (IEP_M) von pH 4,6 bis 6,0, was nach dem oben Gesagten ohne weiteres verständlich ist.

S c h l i e f erklärt diese Erscheinungen mit der unterschiedlichen Proliferationstendenz der Zellen während der einzelnen Phasen des Zyklus.

Je stärker die Proliferation (1. bis 5. Tag), um so mehr Basophile werden gefunden und um so niedriger ist der pH des IEP_M ; je geringer diese Proliferation ist (Ovulationstermin), um so weniger basophile Zellen sind vorhanden und um so höher ist das pH des IEP_M , da die verhornten Epithelzellen mit ihrer stark zurückgegangenen Ladung überwiegen. Er versucht damit den Übergang von Acidophilie zu Basophilie im Papanicolaou-Präparat zu erklären.

Als Farbstoffpaar verwendet Schlieff Methylenblau und Säurefuchsin in je 8 verschiedenen Pufferstufen.

Eine Bestätigung der Ansicht Schliefs sehen wir nach eigenen Beobachtungen und Vergleichen mit der Literatur in der Tatsache, dass die bei der Papanicolaou-Färbung basophil erscheinenden Zellen einen grösseren Kern aufweisen, demnach "jünger" sein müssen als die acidophilen Zellen mit ihren pyknotischen Kernen.

Zur Verwendung von Säurefuchsin als saurem Farbstoff wäre zu erwähnen, dass R i e s und G e r s c h diesen Farbstoff

als weniger geeignet zur IEP-Bestimmung wegen des Auftretens von Ladungsänderungen in den Puffersystemen bezeichnen.

Bei all diesen Bestimmungsmethoden des IEP waren bisher 2 Farbstoffe nötig. Nun hat aber N o r d m e y e r auf Grund der Arbeiten S t r u g g e r s ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren angegeben, mit Hilfe dessen die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wesentlich einfacher durchzuführen ist als mit den bisher gebräuchlichen Verfahren.

Bei dieser Methode wird nur mehr e i n Indikator benutzt, und zwar das Fluorochrom A c r i d i n o r a n g e, das einen ausgesprochenen Konzentrationseffekt von Grün nach Kupferfarben aufweist.

Wirkt das kathodische Acridinorange auf das zu untersuchende Eiweiss-System, - in unserem Falle auf die Epithelzelle -, in einem Milieu ein, dessen pH-Wert unterhalb des IEP dieses Systems liegt, so reagiert dieses auf Grund seiner amphoteren Eigenschaften alkalisch, kann also infolgedessen den fluorochromierenden kathodischen Anteil des Acridinorange nicht elektrostatisch binden.

Das Acridinorange wird nur in ganz geringer Konzentration durch Imbibition von der Zelle aufgenommen, die infolgedessen nur in einem wenig intensiven Grün fluoresziert.

Ganz anders sind die Verhältnisse, wenn das Acridinorange in einem pH-Bereich einwirkt, der höher liegt als der IEP der untersuchten Zelle, weil hier die Ladung der Zelle negativ wird und infolgedessen die Kationen des Acridinorange elektrostatisch gebunden werden können. Das Fluorochrom wird dann in verhältnismässig hoher Konzentration gespeichert, die Zelle erscheint infolge des Konzentrationseffektes kupferfarben leuchtend.

In dem Bereich, in dem die grüne Fluoreszenz in eine stark kupferfarbene umschlägt, liegt somit der IEP der betreffenden Zelle bzw. Zellstruktur.

Diese Acridinorangemethode wurde bei unseren Untersuchungen zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Vaginalepithels verwendet.

Die Ausstriche wurden an bestimmten Tagen des Zyklus entnommen und sogleich nach der Entnahme in 70 %igem Alkohol fixiert. Diese Fixierung wurde von N o r d m e y e r als am besten geeignet bezeichnet.

Nach der Fixierung wurden die Präparate 10 Minuten in Fluorochrompufferlösungen von wechselndem pH fluorochromiert und anschliessend mit farblosem Phosphatpuffer von jeweils demselben pH gespült.

Die Acridinorangelkonzentration betrug 1:2 000, die Pufferlösungen wurden stets frisch hergestellt und vor der Verwendung mit dem P h i l i p s - Gerät kontrolliert.

Die Ausstriche wurden bei drei verschiedenen Gruppen von Frauen vorgenommen:

- 1.) Entnahme aus der postmenstruellen bzw. der frühen Follikelphase (3.-6. Tag post menstruationem), da hier die meisten Basalzellen vorkommen und die Basophilen überwiegen.
- 2.) Entnahme in den Tagen um den Ovulationstermin, da hier für das Ausstrichbild das Überwiegen der acidophilen, oberflächlichen Zellen charakteristisch ist.
- 3.) Entnahme bei Frauen in der Menopause, da hier die Zellen der tieferen Schichten zu überwiegen pflegen bzw. nicht selten fast ausschliesslich vorhanden sind.

Ergebnisse:

- Ad 1) Der Umladungsbereich des Cytoplasmas bei der überwiegenden Zahl der Zellen in der frühen Follikelphase fand sich durchschnittlich bei einem pH von 5,3, der der Kerne der Epithelzellen ist mit einem Wert von 4,2 deutlich niedriger als der der Leukozytenkerne, der bei pH 3,6 liegt.
- Ad 2) Deutlich verschieden davon sind die Werte, welche sich aus Präparaten ergeben, die während der Ovulationsphase entnommen wurden: Der Umschlagspunkt des Cytoplasmas der Vaginalepithelien liegt hier durchschnittlich bei pH 5,9, die Kerne zeigen dagegen eine Änderung der Fluoreszenzfarbe bei pH 4,8, der durchschnittliche IEP für die Leukozytenkerne liegt bei 3,9.
- Ad 3) Ein anderes Bild geben die Ausstriche aus der Menopause. Das Cytoplasma zeigt einen Umschlag bei pH 4,7, während die Kerne schon bei einem pH von 3,9 ihre Fluoreszenzfarbe ändern. Die Leukozyten haben ihren Umladungsbereich im Durchschnitt bei pH 3,6.

Vergleicht man diese Werte miteinander, so muss man zu dem Schluss kommen, dass ein Zusammenhang des IEP der verschiedenen Zellen bzw. Zellstrukturen mit dem Zyklus besteht.

Der IEP in der Ovulationsphase, bei der die oberflächlichen Zellen überwiegen, liegt höher als der der postmenstruellen Phase mit der Vorherrschaft der Basalzellen. Die Werte von Ausstrichen der Menopause, bei denen die Zellen der tieferen Schichten noch deutlicher vorzuherrschen pflegen, liegen etwas tiefer.

Ausgenommen sind hier die Werte für die Leukozytenkerne, die eine Abhängigkeit von dem hormonalen Geschehen nicht erkennen lassen.

F u h r m a n n hat pH-Untersuchungen am unfixierten Vaginalepithel mit der Methode der Supravitalfluorochromierung vorgenommen und dabei pH-Werte erzielt, die etwas tiefer liegen als die Ergebnisse bei fixierten Präparaten. Der Grund für diesen Umstand mag in der Fixierung zu suchen sein.

Wenn auch S t r u g g e r der Ansicht ist, dass durch eine Fixierung mit 70 %igem Alkohol zwar eine Dehydratation der Eiweiss Systeme, aber keine pH-Änderung erzielt wird, so befindet er sich damit im Gegensatz zu R i e s , der eine deutliche Erhöhung der IEP-Werte bei Alkoholfixation beobachtet hat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Veränderungen in der Vaginalschleimhaut während des Zyklus in den veränderten Werten für den isoelektrischen Punkt während der einzelnen Phasen des Zyklus ihren Niederschlag finden.

e) Brauchbarkeit der Fluorochrome.

Bei der grossen Anzahl der untersuchten Fluorochrome liegt die Frage nahe, welche für den Zweck der Untersuchung des Vaginalausstriches am besten geeignet erscheinen. Es hat sich gezeigt, dass von den 50 untersuchten Substanzen nur etwa 15 den Anforderungen gerecht werden, die man zur Erzielung einer einwandfreien Diagnose an sie stellen muss. Trifft man eine noch schärfere Auswahl, etwa nach dem Gesichtspunkt, welche Fluorochrome auch bei Verwendung einer gewöhnlichen UV-Lampe, wie sie dem praktischen Arzt zur Verfügung stehen soll, die Betrachtung in der Oelimmersion mit hinlänglicher Schärfe zulassen, so können nur noch 5 diesen Erfordernissen genügen (s. Tabelle 6).

Für orientierende Untersuchungen ist jedoch eine weit grössere Anzahl (ca. 20) noch brauchbar, die übrigen Fluorochrome weisen zwar z.T. sehr interessante Einzelheiten auf, können aber wegen ihrer geringen Intensität für praktische Zwecke nicht mehr genügen; sie sind lediglich noch von theoretischem Interesse.

Bei den Fluorochromierungsversuchen mit gelösten Substanzen in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:500 000 zeigt sich, dass die Intensität der Fluoreszenz im Gegensatz zu den Hellfeldfarbstoffen nicht direkt proportional der Konzentration ist. Bei einigen Fluorochromen, die gleichzeitig auch diachromatische Eigenschaften haben, wie etwa das Auracin, Auramin, Brillantphosphin, lässt sich dieser Unterschied gut demonstrieren:

Während bei Anfärbung in der Hellfeldmikroskopie die besten Ergebnisse bei einer Farbkonzentration von 1:100 bis 1:1 000 erzielt werden und bei grösseren Verdünnungen keine brauchbaren Bilder mehr entstehen, können einwandfreie Fluoreszenzbilder erst in einer Konzentration der Fluorochromlösung von 1:1 000 und darüber erzielt werden. Das Maximum der Intensität liegt zwischen einer Konzentration 1:1 000 und 1:10 000. Bei stärkerer Verdünnung nimmt die Leuchtstärke wieder ab, bei höherer Konzentration wird das Fluoreszenzbild durch Überfärbung und Strukturüberlagerungen gestört.

Diese Regel gilt ohne Ausnahme für die sehr guten, guten und mittleren Fluorochrome (1-20); bei der grossen Zahl der schwächeren Fluorochrome tritt ein derartiger Effekt nicht immer mit Sicherheit ein (Nr. 20 und darüber).

Die Stärke und Brauchbarkeit eines Fluorochroms können gut durch Konzentrationsversuche ermittelt werden, weil dadurch seine "maximale Wirkungsbreite" festgestellt werden kann. Unter maximaler Wirkungsbreite sei der Konzentrationsbereich verstanden, in dem das betreffende Fluorochrom bei gleichlanger Einwirkungsdauer auf das Präparat seine grösste Leuchtkraft hat.

So haben z.B. Thioflavin S, Berberinsulfat, Primulin O eine ausserordentlich grosse M.W.B., die bei Atebrin, Diamantphosphin, Auracin schon deutlich kleiner ist, während bei schwächeren Fluorochromen, wie etwa Geranin, Nicotin etc. die M.W.B. zwar nicht weiter verkleinert ist, aber die Intensität, also die Stärke der emittierten Strahlung, zu gering wird.

Ein gutes Fluorochrom hat aber in erster Hinsicht zwei Forderungen zu erfüllen, wenn es für die vaginalcytologische Diagnostik in Frage kommen soll:

- 1.) Es muss eine genügend starke Leuchtkraft besitzen (nicht unter +++(+) unserer Skala), die Intensität der beobachteten Fluoreszenz muss also gross genug sein.
- 2.) Es muss seine Leuchtkraft in einem möglichst grossen Konzentrationsbereich behalten, es soll also eine grosse M.W.B. besitzen, dadurch ist ein ausreichendes Sichtbarwerden auch derjenigen Strukturelemente gewährleistet, die das Fluorochrom nur in geringer Konzentration zu speichern vermögen.

Das Integral aus Intensität und maximaler Wirkungsbreite muss also für ein gutes Fluorochrom möglichst gross sein.

Näheren Aufschluss über das diesbezügliche Verhalten einiger wichtiger Fluorochrome geben die Kurven der Tabelle 7.

Die für die Untersuchung am Vaginalausstrich günstigste Konzentration ist bei der Tabelle über die Intensität der Fluorochrome jeweils angegeben, in der Regel kann eine Verdünnung von 1:1 000 bis 1:5 000 mit gutem Erfolg angewendet werden, doch sind bei verschiedenen Fluorochromen noch Konzentrationen von 50 000 zur Anfärbung der Präparate gut geeignet. Auch kleinere Konzentrationen, wie etwa 1:100 000 und darunter ergeben bei vielen Fluorochromen noch sehr schön leuchtende und gut differenzierte Bilder, wenn man nur die entsprechenden Einwirkungszeiten wählt, die dann allerdings nicht mehr nach Minuten, sondern nach Stunden (12 und mehr) zählen.

Es ist klar, dass derartige Konzentrationen für die praktische Anwendung im Laboratorium nicht mehr geeignet sind.

Wichtig ist ausserdem, da die Fluorochromierungszeiten für die Praxis nicht zu gross sein dürfen, die Konzentration so auszusuchen, dass das Präparat bei der Betrachtung mit gewöhnlichem Licht ungefärbt oder doch nur ganz wenig gefärbt wirkt, da erst dann Fluoreszenzbilder von bester Differenzierung und maximaler Stärke erzielt werden (H a i t i n g e r).

f) Die Fluoreszenz der einzelnen Zellstrukturen.

Ganz allgemein lässt sich sagen, dass die Kerne stets eine intensivere Fluoreszenz aufweisen als das Protoplasma, auch wenn sie nicht durch Metachromasie besonders hervorgehoben sind.

Erscheint z.B. beim Berberinsulfat das Cytoplasma gelblich grün, so sind die Kerne leuchtend gelb-grün fluoro chromiert.

Auch hier liegt die Erklärung in der grösseren Affinität der Kernstrukturen zum Farbstoff bzw. Fluorochrom.

Weiterhin fällt die Tatsache auf, dass der Ausstrich in dicken Schichten oft in einer anderen Farbe aufleuchtet als in einfachen Zellagen. Es entstehen meist hell blauweisse Strahlungseffekte, die infolge ihrer Blendwirkung ausserordentlich störend wirken; es ist daher wichtig, das entnommene Material dünn genug auszustreichen.

Die guten Fluorochrome (s. Tabelle 6) sind alle geeignet, Kern und Protoplasma gut voneinander abzugrenzen, auch die Leukozyten werden gut von ihnen dargestellt. Meist fluoreszieren die Kerne der Leukozyten in einem etwas dunkleren Farbton als die der Vaginalepithelien.

Bakterien, in erster Linie kommen hier Döderlein'sche Stäbchen in Betracht, werden nahezu von allen besseren Fluorochromen deutlich sichtbar gemacht, sie fluoreszieren fast stets in einem schön leuchtenden Gelb oder Orange.

Die einzelnen Kernbestandteile, z.B. die Nucleolen werden am besten von Thioflavin S, Primulin O und Berberinsulfat hervorgehoben, sie färben sich etwas dunkler als der Kern an.

Die Kerne der Leukozyten werden von Thioflavin S besonders gut dargestellt; auch das sonst nicht sehr gute Fluorochrom Nicotin lässt die Leukozyten bei einer Konzentration von 1:100 recht schön hervortreten, während die anderen Bestandteile des Präparates weniger deutlich fluoreszieren. Für eine genauere Analyse ist allerdings das Nicotin wegen seiner zu geringen Intensität nicht mehr zu verwenden.

Auch im Plasma lassen sich bei der Wahl geeigneter Fluorochrome weitere Einzelheiten erkennen. So zeigt z.B. das Coriphosphin im Protoplasma leuchtend gelbe, stäbchenförmige Strukturen, deren Natur nicht einwandfrei festgestellt werden konnte, wahrscheinlich handelt es sich um stäbchenförmige Mitochondrien oder Plasmosomen.

Bei Verwendung von Brillantphosphin oder Aurophosphin werden im Cytoplasma leuchtend giftgrüne Granula sichtbar, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Mitochondrien bzw. Lipochondrien handelt. Sie heben sich mit ihrer eindrucksvollen Fluoreszenz besonders auffällig von dem umgebenden mattgrünen Grundplasma ab. Leider sind sie nicht beständig, bei längerer Betrachtung verschwinden sie unter der Einwirkung der UV-Strahlen, so dass z.B. eine photographische Aufnahme dieser Strukturen nicht möglich ist.

Überhaupt ist ein zu langes Einwirken von UV-Licht zu vermeiden, weil dadurch die Qualität der Bilder infolge Ausbleichens ausserordentlich vermindert wird.

Werden die Präparate jedoch im Dunklen aufbewahrt und mit einem Deckglas vor Staub geschützt, so haben die Ausstriche eine recht lange Lebensdauer; im Gegensatz zu den Aufschwemmungspräparaten, die nach F u h r m a n n bald von Pilzen überwuchert werden. Jedenfalls ergeben Präparate mit einem Alter von 6-9 Monaten noch recht gute Fluoreszenzbilder.

V. Diskussion.

=====

Es erhebt sich nun nach dem Vorhergegangenen die Frage, welche praktischen Folgerungen sich für die klinische Diagnostik aus diesen Untersuchungen ergeben.

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet eine Reihe von Vorteilen, die sie für eine Verwendung im cytologischen Laboratorium besonders geeignet erscheinen lässt.

Ihre Vorzüge kommen erst bei der Verwendung der F l u o r o - c h r o m e zur Geltung: das Abstrichpräparat, das in seiner Eigenfluoreszenz nur schwachblaue bis blaugrün gefärbte, nicht leicht zu erkennende Einzelheiten bietet, leuchtet nach der Fluorochromierung hell auf einem dunklen Untergrund, so dass die einzelnen Strukturelemente auch mit starker Vergrößerung untersucht werden können.

Unter den Vorzügen wäre hier in erster Linie die geringe Konzentration zu erwähnen, in der die Fluorochrome bei der Herstellung der mikroskopischen Präparate verwendet werden. Es werden in der Regel keine Konzentrationen benutzt, die höher liegen als maxi-

mal 1 Teil Substanz auf 1 000 Teile Lösungsmittel, während die Hellfeldfarbstoffe wesentlich höhere Konzentrationen aufzuweisen pflegen.

In Verbindung mit der Tatsache, dass bei den Fluorochromen meist nur sehr kurze Einwirkungszeiten in Frage kommen, ergeben sich hieraus wesentliche Vorzüge gegenüber der Hellfeldmikroskopie. Man kann erwarten, dass die zu untersuchenden Zellen durch das kurze Einwirken und die geringe Konzentration der Fluorochrome wesentlich weniger in ihrer Struktur und ihrem chemisch-physikalischen Verhalten beeinträchtigt werden als bei Verwendung von geringeren Verdünnungen.

Auch das raschere Arbeiten, das durch die kürzeren Fluorochromierungszeiten gewährleistet wird, stellt eine Erleichterung gegenüber den bisherigen Verfahren dar.

Ein weiterer Vorzug der Fluoreszenzmikroskopie liegt darin, dass das fertige Präparat bei Verwendung eines einzigen Fluorochroms häufig in zwei oder mehr Farben oder Farbtönen aufleuchtet, sodass sich sehr deutliche Kontraste erkennen lassen und die Präparate an Leuchtkraft und Deutlichkeit manchen Hellfeldpräparaten überlegen erscheinen.

Eine Eigenschaft sehr vieler Fluorochrome ist es auch, dass sich mit ihnen Kerne und Plasma sehr gut voneinander differenzieren lassen. Ein Vorteil gegenüber der Papanicolaou-Methode besteht darin, dass der durch die grosse Cuvettenzahl bedingte Zellverlust beim Fluorochromieren nicht auftritt. Die Technik beim Fluorochromieren ist nämlich ausserordentlich einfach: Man lässt das Präparat einige Minuten in der Lösung, um dann zu spülen und zu trocknen. Eine weitere Behandlung ist dann nicht mehr notwendig.

Aber auch die Nachteile dieser Methode gegenüber der Hellfeldmikroskopie dürfen nicht unerwähnt bleiben.

So ist bei der Fluoreszenzmikroskopie stets eine Zusatzapparatur notwendig, die relativ kostspielig ist.

Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Beobachtung der fluorochromierten Präparate nur im Dunkeln vorgenommen werden kann, sodass ein verdunkelbarer Raum zur Verfügung stehen muss.

Ausserdem muss sich der Untersucher jedesmal adaptieren, was immer eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt.

Setzt man ein Präparat länger der Einwirkung von UV-Licht

aus, wie etwa bei der Anfertigung einer mikrophotographischen Aufnahme, so lässt mit der Zeit die Fluoreszenzintensität etwas nach. Bei gewöhnlicher Beobachtungsdauer fällt diese Tatsache allerdings nicht ins Gewicht.

Ob die Haltbarkeit der Präparate geringer ist als die der Hellfeldmikroskopie, kann wegen der Kürze der Beobachtungszeit nicht beurteilt werden. Jedenfalls ist es wichtig, sie vor Licht geschützt aufzubewahren.

Aus unseren Untersuchungen ergibt sich, dass die Fluoreszenzmikroskopie eine brauchbare Untersuchungsmethode für das cytologische Laboratorium zu sein scheint.

Die Ausstrichuntersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie kann andere Färbeverfahren ergänzen oder ersetzen.

Sie kann Anwendung finden z.B. bei der Kontrolle der Hormonwirkungen oder bei der Differentialdiagnose von Amenorrhöen, oder sie kann zur Krebsfährtsuche verwendet werden.

Thioflavin S, Chroma-Primulin oder auch Acridinorange können zur Kontrolle der Hormonwirkungen auf das Scheidenepithel Anwendung finden. Hier könnte die Anfertigung eines Scheidencytogrammes nach N y c l i ě k mit den Methoden der Fluoreszenzmikroskopie empfohlen werden.

N y c l i ě k, der seine Ausstriche nach P a p a n i c o l a o u färbt, verwendet dazu eine Skala, ein sog. Cytogramm, in das er seine mikroskopischen Befunde für das Vaginalepithel aus Ausstrichen folgendermassen einträgt:

<u>Datum</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>i.a.</u>	<u>l</u>
12.X.54	60-70	30-40	0	0	0-10	+++

Erläuterung:

a = Parabasale Zellen; b = Zellen der mittleren Schicht;

c = Oberflächliche Zellen; d = Kernlose Zellen;

i.a. = Prozentuale Anzahl sämtlicher Abstrichschichten;

l = Anzahl der Leukozyten von 0 - +++;

Der Verfasser unterscheidet einen atrophischen (a:60-70; b:30-40; c:0; d:0; i.a.:0-10; l:+++;),

einen hypöstrischen (a:0-20; b:50-60; c:20-30; d:0; i.a.:10-30; l:+++;),

und einen hyperöstrischen Typ (a:0; b:0; c:70-90; d:10-30; i.a.:

60-80; 1:0-+;).

Als Fluorochrom scheint das Thioflavin S hier besonders geeignet zu sein, da bei dieser Substanz eine starke Metachromasie auftritt, durch die oberflächliche und tiefe Zellen leichter unterschieden werden können.

Ausserdem wird durch dieses Fluorochrom auch noch eine auffallend gute Leukozytendarstellung möglich; ebenso werden die Zellkerne besonders deutlich hervorgehoben, was für die Entscheidung, ob eine Zelle aus den oberflächlicheren oder tieferen Schichten des Vaginalepithels stammt, von Wichtigkeit ist.

Zudem sind die Färbezeiten wesentlich kürzer als bei der Methode nach Papanicolaou.

Ein anderes Verfahren zur Kontrolle der Follikelhormonwirkung wurde 1952 von R o t h angegeben. Er verwendet als Kriterium zur Hormondiagnose nicht die Acidophilie, sondern die Anzahl der Zellen mit pyknotischem Kern, da nach P u n d e l die Acidophilie dem Follikelhormoneinwirken nachhinken kann, die Pyknose aber stets und sofort sichtbar wird.

R o t h trägt die prozentuale Anzahl der pyknotischen Kerne in ein Koordinatensystem ein, die resultierende Kurve der Beobachtungen während des ganzen Zyklus bezeichnet er als das K o l p o p y k n o g r a m m .

Er gewinnt mit dieser Methode wichtige Aufschlüsse, z.B. bei der Unterscheidung von primären und sekundären Amenorrhöen. Ganz charakteristische Kurvenabläufe lassen sich auch bei Follikelpersistenz und Corpus-luteum-Insuffizienz beobachten.

Für das Kolpopyknogramm wurde bisher die Färbung nach P a p a n i c o l a o u oder die Phasenkontrastmikroskopie verwendet. Da bei dieser Methode in kurzen Abständen zahlreiche Ausstriche untersucht werden müssen, ist hier der Vorteil, den eine Untersuchung mittels des Fluoreszenzmikroskopes bietet, besonders augenfällig.

Speziell das Berberinsulfat, das Rivanol, das Thioflavin S und das Chroma-Primulin liefern in ausserordentlich kurzer Zeit (Konzentration 1:1 000, Fluorochromierungszeit 2 Minuten) sehr schöne scharfe Bilder, bei denen die Kernstrukturen deutlich hervortreten und mühelos differenziert werden können. Am brauchbarsten ist hier das Berberinsulfat.

Auch zur Diagnose einer glandulären Hyperplasie oder von Abortus imminens, incipiens bzw. incompletus (S t o l l , M u t h) müsste die Fluorochromierung der Ausstriche geeignet sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fluorochromierung des fixierten Vaginalausstrichs für die gynäkologische Diagnostik wegen ihrer einfachen Handhabung und ihrer klaren und leuchtenden Bilder eine gute und brauchbare Methode darstellt, die besonders zur Zyklusdiagnose geeignet ist. Es muss die Erfahrung lehren, wie weit sich die Fluoreszenzmikroskopie bei der Carcinomdiagnostik zu bewähren imstande ist. Untersuchungen darüber sind im Gange.

VI. Zusammenfassung.

=====

In der Arbeit wurde sowohl die Eigenfluoreszenz des fixierten Vaginalausstriches als auch seine Sekundärfluoreszenz nach Fluorochromierung mit etwa 50 Fluorochromen in ca. 2 500 Präparaten untersucht. Es wurde der Einfluss der Fixierung, der Konzentration der Fluorochrome und der Änderung des pH-Milieus auf die Fluorochromierungsergebnisse erforscht sowie versucht, den isoelektrischen Punkt der fixierten Vaginalepithelien auf fluoreszenzmikroskopische Weise zu bestimmen.

Zuletzt wurden die Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie in der vaginalcytologischen Diagnostik erörtert.

Ergebnisse:

Zur Beobachtung der Eigenfluoreszenz ist die Formolfixierung am besten geeignet, die Eigenfluoreszenz der Vaginalepithelien ist aber zu schwach, um Einzelheiten erkennen zu lassen. Ein Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Eigenfluoreszenz konnte nicht festgestellt werden.

Bei den fluorochromierten Ausstrichen haben sich die Fixierungen mit Alkohol-Aether sowie die mit Formol am besten bewährt und als gleichwertig erwiesen.

Es zeigte sich, dass etwa 15 Fluorochrome die Anforderungen

erfüllen, die zur Erzielung einer einwandfreien Diagnose an sie gestellt werden müssen, also eine ausreichend starke Leuchtkraft im UV-Licht zu besitzen und bei kurzen Fluorochromierungszeiten auch diejenigen Strukturelemente noch sichtbar werden zu lassen, die das Fluorochrom nur in geringer Konzentration zu speichern vermögen. Die optimale Konzentration lag bei 1:1 000 bis 1:10 000.

In Verdünnungsreihen wurde der Konzentrationseffekt nach S t r u g g e r untersucht und die Ergebnisse in Tabellen festgehalten.

Von den 50 Fluorochromen zeigten 16 einen deutlich erkennbaren derartigen Effekt, es handelte sich meist um kathodische Fluorochrome.

Ferner wurde festgestellt, dass die Fluoreszenzfarbe sich bei steigender Verdünnung in Richtung der kürzeren Wellenlänge verschiebt.

Auch das Phänomen der Metachromasie wurde untersucht; dabei ergab sich, dass zwischen der Metachromasie und dem Konzentrationseffekt offenbar eine Beziehung besteht.

Auf die Zusammenhänge zwischen Alter der Zelle und Fluorochromierbarkeit wurde eingegangen.

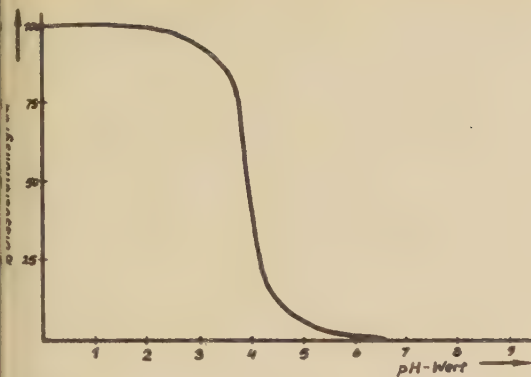
Eine Einwirkung der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Fluorochromierungsergebnisse wurde theoretisch besprochen, die Versuchsergebnisse wurden in einer Tabelle wiedergegeben. Es zeigte sich, dass die kathodischen Fluorochrome zur Untersuchung der Ausstriche am besten geeignet sind.

Der isoelektrische Punkt der fixierten Vaginalepithelien wurde mit der Acridinorangemethode bestimmt, für die verschiedenen Phasen des Zyklus wurden Werte gefunden, die zwischen pH 3,9 und 4,8 für die Kerne und zwischen 4,7 und 5,9 für das Cytoplasma lagen.

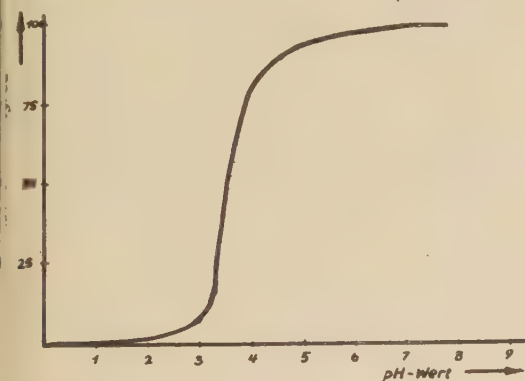
Die gewonnenen Werte wurden mit denen anderer Autoren verglichen. Schliesslich wurde die Brauchbarkeit der verschiedenen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie in der cytologisch-gynäkologischen Diagnostik erörtert und einige Beispiele für ihre praktische Anwendung aufgeführt.

Abschliessend wurde festgestellt, dass die Benutzung des Fluoreszenzmikroskops bei der Betrachtung des Vaginalausstriches eine gute Ergänzung zur bisher gebräuchlichen Untersuchungstechnik darstellt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.
Dyroff für die Überlassung des Themas und Herrn Dr.
K. Fuhrmann für seine Unterstützung und Beratung bei
der Durchführung der Arbeit.



Dissoziationskurve
kathodischer Fluorochrome.
(Nach S t r u g g e r)



Dissoziationskurve
anodischer Fluorochrome.
(Nach S t r u g g e r)

Tabelle 1.

Vergleich der Konzentration von Diachromen und Fluorochromen.
(Nach S t r u g g e r)

Konzentration	2 1:10	3 1:10	4 1:10	5 1:10	6 1:10	7 1:10	8 1:10
Methylenblau	tief dunkel- blau	tief dunkel- blau	tief durchs. blau	hell- blau	Spur Blau	-	-
Acridinorange	kupfer- rot	orange- rot	gelb- grün	grün	hell grünl. grau	hell grünl. grau	Spur

Tabelle 2.

Fluoreszenz der Zellkerne des Vaginalepithels bei einer Konzentration von :

	1: 100	1: 1000	1: 5000	1: 10 000	1: 50 000	1: 100 000	1: 500 000	Intensität bei 1: 1000
Fluorochrom								
Acridin- orange	Kupfer- Orange	Gold- Geld	Gelb	Grüngelb- Leuchtend	Gelbgrün- Leuchtend	Hellgrün- Leuchtend	Hellgrün- Leuchtend	+++ (+)
Brillant- dianilgrün	Gelb- Grün	Hellgelb- Grün	Hell- Grün	Blau- Grün	Blau- Grün	Grün- Blau	Bläulich	+++
Coriphosphin	Orange	Gold- Orange	Gold- Gelb	Gelb	Gelbgrün	Hell- Grün	Blau- Grün	+++ (+)
Diamant- phosphin	Gold- Gelb	Gold- Gelb	Gelb	Gelb- Grün	Grün	Bläulich- Grün	Blau- Grün	+++
Brillant- phosphin	Gold- Orange	Leuchtend Gelb	Gelb	Hell- Gelb	Gelb- Grün	Bläulich- Grün	Blau- Grün	+++
Aurophosphin	Gold- Orange	Gold- Gelb	Hell- Goldgelb	Grün- Gelb	Gelb- Grün	Hell- Grün	Bläulich- Grün	+++
Auramin	Gelb	Grünlich- Gelb	Leuchtend- Gelbgrün	Grün- Gelb	Grün- Gelb	Blau- Grün	Blau- Grün	+++
Auracoin	Gold- Gelb	Gold- Gelb	Gelb	Gelb- Grün	Hell- Grün	Blau- Grün	Blau- Grün	+++
Euchrysin GGNX	Orange- Gelb	Gelb	Grün- Gelb	Gelb- Grün	Hell- Grün	Blau- Grün	Blau- Grün	+++

Acridin	Gold-Gelb	Gelb	Gelb	Grün-Gelb	Gelb-Grün	Blau-Grün	++(+)
Rheonin	Gelb-Braun	Gelb	Hell-Gelb	Gelb-Grün	Gelb-Grün	Grün	++(+)
Geranin	Rötlich	Rötlich-Gelb	Gelblich	Gelblich-Grün	Gelblich-Grün	Grünlich	++
Thiazinrot	Matt-rot	Gelb-Rot	Gelb-Rot	Gelb-rötlich	Hellgelb-rötlich	Bläulich-Gelb	+++
Orcein	Gelbl. Leucht.	Hell-weißgelb	Weiß-gelb	Bläulich	Weiß-blau	Weiß-Blau	+(+)
Dimethylami-noazobenzol	Gelb	Gelb	Gelb-Grün	Gelb-Grün	Grün	Grün	+
Cumarsäure	Bläulich-Grün	Bläulich-Grün	Bläulich-Grün	Grün-Blau	Grün-Blau	Hell-Blau	++(+)

Tabelle 3.

Metachromasie.

Fluorochrom	Zytopl. d.Vag.Z.	Kern d.Vag.Z.	Leukozyten Kern	Döderl.	Konzentr.
Acridin- orange	Moos- Grün	Gold- Gelb	Gelb- Orange	Orange	1 : 1000
Brillantdia- nil-Grün	Grün- Blau	Leucht. Grün	Türkis- Grün	Grün	1 : 1000
Coriphosphin	Moos- Grün	Gold- Orange	Gold- Orange	Orange	1 : 1000
Diamant- phosphin	Moos- Grün	Goldgelb	Gold- Gelb	Orange	1 : 1000
Brillant- phosphin	Moos- Grün	Leucht. Gelb	Orange- Gelb	Orange	1 : 1000
Aurophosphin	Moos- Grün	Leucht. Gelb	Gold- Gelb	Gelb- Orange	1 : 1000
Auramin	Laub- Grün	Gelb- Grün	Gelb- Grün	G e l b	1 : 1000
Auracin	Laub- Grün	Grün- Gelb	Grün- Gelb	Grün	1 : 1000
Euchrysin GGNX	Laub- Grün	Gelb- Grün	Grün- Gelb	Orange	1 : 1000
Acridin	Moos- Grün	Gelb	Gelb	Orange	1 : 1000

Einwirkungsdauer der Fluorochrome 3 - 4 Minuten.

Tabelle 4.

Brilliantphosphin			Fluorescein		MA.	Sulforhodamin B	
pH	Kerne D.VE	Intensität	Kerne	Intensität	Kerne	Intensität	
2,1	Helbläulich	+	Gelblich Grün	+++	Gelb Rot	++	
3,4 - 3,9	Helbläulich	+	Gelblich Grün	+++	Rötlich Gelb	++ (+)	
4,6 - 4,9	Gelblich	++	Gelblich Grün	+++	Orange	+++	
5,6 - 5,7	Hellgelb	++ (+)	Hellgrün	+++	Orange	+++	
6,3 - 6,5	Hellgelb	+++	Hellgrün	++ (+)	Gelborange	+++	
7,0 - 7,1	Gelb	+++	Hellgrün	++	Gelborange	++ (+)	
7,5 - 7,6	Goldgelb	+++	Hellgrün	++ (+)	Orangegelb	+++	
8,0 - 8,3	Goldgelb	+++	Bläulich Grün	++ (+)	Orange - Gelb	+++	
9,8 - 10,1	Goldgelb	+++	Bläulich Grün	+	Orange - Gelb	++ (+)	
10	Gelb	++ (+)	Bläulich Grün	+	Orange - Gelb	++ (+)	

Tabelle 5.

Fluorochrom	Umschlag von	der V.E. Kerne zu	Bei pH-Lösung Nr.
Thioflavin S	Bläulich + + +	Blau - Türkis - Gelb + + + +	2 / 3
Primulin O	Türkis-Blau-Gelb + + + +	Blau - Gelblich + + + (+)	4 / 5
Chroma - Pr.	Blau - Gelblich + + + +	Blau - Gelblich + + + (+)	4 / 5
Rivanol	Zartgrün + + +	Gelbgrün + + + +	2 / 3
Brillant-Dianil-Grün	Weißl.-Grün-Blau + + +	Grünblau + + + +	3 / 4
Coriphosphin	Hellgrün + + (+)	G e l b + + + (+)	3 / 4
Acridinorange	Hellgrün + + (+)	Kupfergelb + + + (+)	3 / 4
Auramin	Gelbgrün + + (+)	Grüngelb + + +	3 / 4
Auracin	Hellgrün + + (+)	Grüngelb + + +	3 / 4
Fluorescein - NA	Gelblich Grün + + +	Hellgrün + +	4 / 5
Diamant-phosphin	Zartgrün + + (+)	Grüngelb + + +	3 / 4

Fluorochrom	Umschlag von	der V.E. Kerne zu	Bei pH-Lösung Nr.
Brillant-phosphin	Grüngelb + + (+)	Gelb + + +	3 / 4
Aurophosphin	Gelbgrün + + (+)	G e l b + + +	3 / 4
Euchrysin GGNX	Gelbgrün + + (+)	G e l b + + +	3 / 4
Nicotin	Bläulich + (+)	Bläulich + + (+)	2 / 3

Pufferlösung	Nr.	p H.
	1.	2,5 - 3,4
	2.	3,4 - 3,9
	3.	4,6 - 4,9
	4.	5,6 - 5,7
	5.	6,3 - 6,5
	6.	7,0 - 7,1
	7.	7,5 - 7,6
	8.	8,0 - 8,3
	9.	9,8 - 10,1
	10.	10

Tabelle 6.

Nr.	Fluorochrom	Für Kurz- fluoro- chrom.opt. Konzentr.	Zytoplasma der Vag.- Epithelien	Kerne der Vag.- Epithelien	Kerne der Leukozyten	Döderlein- sche Stäb- chen	Intensi- tät	Besonders geeignet z. Darstellung von
1	Thiofla- vin S	1 : 1000 1 : 10000	Gelblich bis Blau	Leucht- gelbl. bis Leuchtwas- serblau	Gelb-bräun- lich bis Bläulich	-----	++++	Leukozyten- kerne
2	Berberin- sulfat	1 : 1000 1 : 10000	Gelbgrün	Leucht- gelbgrün	Leucht- gelbgrün	Gelb- orange	++++	Kerne Döderl.
3	Primulin O	1 : 1000 1 : 10000	Gelblich bis Hellblau	Leucht- gelbl. bis Leucht- hellblau	Bläulich- Gelb		++++	Leukozyten- kerne
4	Rivanol	1 : 1000 1 : 10000	Gelb- Grün	Leucht- gelbgrün	Leucht- gelbgrün	Gelb	++++	Kerne
5	"Chroma" Primulin	1 : 1000 1 : 10000	Gelblich bis Mattblau	Gelb bis Hellblau Leucht.	Leucht. gelblich bis hell- blau	Gelblich	++++	Leukozyten- kerne
6	Brillant- Dianilgrün	1 : 1000 1 : 5000	Matt- grünblau	Leucht- grünblau	Leucht. Türkisgrün	Grünlich	+++ (+)	Leukozyten
7	Cori- Phosphin	1 : 1000 1 : 5000	Moosgrün- Gelbgrün	Leucht- gelb bis Gelbgrün	Leucht- Goldgelb	Gelb- Orange	+++ (+)	Döderlein- Kernplasma
8	Atebrin	1 : 1000 1 : 5000	Hellgrün	Leucht- grün	Leucht- grün	Grünlich	+++ (+)	
9	Acridin- Orange	1 : 1000 1 : 5000	Kupferfar- ben bis Grün	Goldgelb Grüngelb	Goldgelb	Orange	+++ (+)	Döderlein- Kernplasma

10	Auramin	1 : 1000 1 : 5000	Laubgrün	Leucht- Grüngelb	Leucht- Grüngelb	Gelb	+++ (+)	Kerne Leukozyten
11	Auracin	1 : 1000 1 : 5000	Laubgrün	Leucht- Grüngelb	Leucht- Grüngelb		+++	Kerne Leukozyten
12	Fluores- cein NA	1 : 1000 1 : 5000	Mattgrün	Hellgelb- grün- leucht.	Hellgelb- grün- leucht.	Grün	+++	
13	Diamant- Phosphin	1 : 1000 1 : 5000	Moosgrün bis Gelbgrün	Gelb bis Gelbgrün Leucht.	Gelb- Orange	Orange	+++	Döderlein Kerne Leukozyten
14	Brillant- Phosphin	1 : 1000 1 : 5000	Moosgrün bis Gelbgrün	Gelb- Gelbgrün- Leucht.	Gelb- Orange	Gold- Orange	+++	Döderlein Kerne Leukozyten
15	Auro- Phosphin	1 : 1000 1 : 5000	Moosgrün bis Gelbgrün	Leucht- Gelbgrün bis Gelb	Goldgelb	Gelb- Orange	+++	Döderlein Kerne Leukozyten
16	Euchrysin GGNX	1 : 1000 1 : 5000	Laubgrün	Leucht- Gelbgrün	Gelb- Leucht.	Orange	+++	
17	Rhodamin B	1 : 1000 1 : 5000	Orange- Gelb	Leucht- Gelborange	Leucht- Gelborange	Orange	+++	Döderlein Kerne
18	Sulforho- damin B	1 : 1000 1 : 5000	Matt- Orange	Orange- Gelb	Gelb- Orange	Gelb- Orange	+++	
19	Rheonin Acridin	1 : 1000 1 : 5000	Moos- Grün	Leucht- Gelb	Gelb- Leucht.	Gelb- Orange	++ (+)	Kernplasma
20	Rheonin	1 : 1000 1 : 5000	Mattlaub- Grün	Gelb- Grün- Leucht.	Goldgelb Bräunlich Gelb	Orange Gelb	++ (+)	

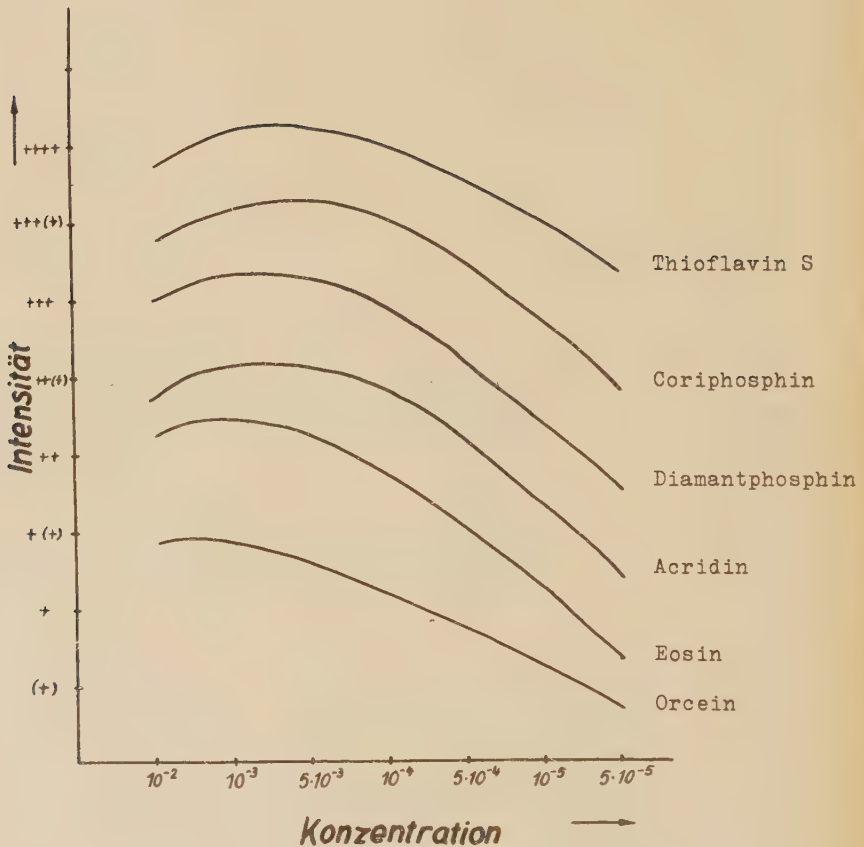
Nr.	Fluorochrom	Für Kurz- fluoro- chrom.opt. Konzentr.	Zytoplasma der Vag.- Epithelien	Kerne der Vag.- Epithelien	Kerne der Leukozyten	Döderlein- sche Stäb- chen	Intensi- tät	Besonders geeignet z. Darstellung von
21	Cumarsäure	1 : 1000 1 : 5000	Blau- Grün	Leucht- Blaugrün	Leucht- Blaugrün	-----	++ (+)	
22	Eosin	1 : 1000 1 : 5000	Zartgrün	Leucht- Hellgrün	Leucht- Gelbgrün	Grünlich	++ (+)	
23	Nicotin	1 : 100 1 : 500	Silber- Weiss	Leucht- Weiss	Hell Weissl. Leucht.	-----	++ (+)	Leukozyten- kerne
24	Pyronin	1 : 1000	Gelblich bis Bläulich	Gelb- Leucht.	Dunkelgelb- Leucht.	-----	++ (+)	
25	Geranin	1 : 1000	Bläulich und Rötlich	Hellblau Hellröt- lich	Hellbläu- lich und Rötlich	-----	++	
26	Kongorot	1 : 1000	Mattblau	Hellblau	Hellblau	-----	++	
27	Thiazinrot	1 : 1000	Matt- Bläul.- Rötlich	Hellblau bis Rötlich	Hellblau bezw. Rötlich	-----	++	
28	Azokarmin	1 : 1000	Matt- Rötlich	Gelbrot	Orange- Rot	-----	+ (+)	
29	Barbitur- Säure	1 : 1000	Matt- Blau	Heller Blau	Heller Blau		+ (+)	
30	Orcein	1 : 1000	Rötlich	Weisslich	Rötlich bis Bläulich	-----	+ (+)	

31	Novocain	1 : 1000	Mattgrün- Blau	Heller Bläulich	Hellblau Or.Leucht.	----	+
32	Salizyl- säure	1 : 100 1 : 1000	Matt- Blau	Hell- Blau	Hell- Blau	----	+
33	Säure- fuchsin	1 : 1000	Matt- Grün	Heller Grünlich	Heller Grünlich	----	+
34	Umbelli- ferin	1 : 1000	Zart- Blau	Hell- Blau	Hell- Blau	----	+
35	Chinin	1 : 1000	Matt- Bläulich	Heller Bläulich	Heller Bläulich	----	+

Außerdem untersuchte Substanzen, bei denen keine oder keine nennenswerte Fluoreszenz erzielt wurde:

Chlorophyll, Chrysoidin, Dimethylaminoozobenzol, Erythrosin, Fuchsin Bas., Methylenblau, Goldchlorid, Malachitgrün, Neutralrot, Nilblau Sulfat, Orange G., Safranin, Sionin, Toluidinblau, Jod.

Tabelle 7.



Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration bei gleicher Fluorochromierungszeit (4 Min.) und gleicher Intensität der erregenden Strahlung.

VIII. Literaturverzeichnis.

=====

- | | |
|---|--|
| Ayre, J.E. | cit. n. Zinser. |
| Bruns, G. und Beerhalter, H. | Act. Histochem. 1, 254 (1955). |
| Denzler | cit. n. Strugger. |
| Dhéré, Ch. | Abderh. Handb. d. biol. Arb. Meth. II/3,4 (1933). |
| Eisenbrand | cit. n. Dhéré. |
| Foot | cit. n. Zinser. |
| Friedman, H.P. | Am. Journal of Obst. 59, 852 (1950). |
| Gersch | cit. n. Ries. |
| Glassman | s. Mellors. |
| Graham | cit. n. Zinser. |
| Haitinger, M. | Die Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig, Akad. Verl. Ges. (1938). |
| Mellors, R.C., Glassman, A., Papanicolaou, G.N. | Cancer 5, 458 (1952). |
| Mellors, R.C., Silver, R. | Science 114, 356 (1951). |
| Nordmeyer, N. | Zbl. Bakter. 152, 54 (1947). |
| Nycliček, O. | Zbl. Gyn. 74, 1512 (1952). |
| Papanicolaou, G.N. u. Traut, H.F. | The Epithelia of Womans Reproductive Organs. New York, The Commonwealth Fund (1948). |
| Pischinger, A.Z. | Zellforsch. u. mikr. Anat. 3, 169 (1926). |
| Pundel, J.P. | Les Frottis Vagineaux et Cerviceaux. Paris, Masson & Cie. (1950). |
| Ries, E. | Grundriss der Histophysiologie. Leipzig, Akad. Verl. Ges. (1938). |
| Roth, O.A. | DMW, 77,4 (1952); Zbl. Gyn. 38, 1489 (1952). |
| Ružička | cit. n. Ries. |
| Scheibe | Nat. wiss. 6, 168 (1948). |
| Schließ, H. | Arch. Gyn. 184, 324 (1954). |
| Stoll u. Muth | Gebh. u. Frhk. 5, 424 (1952). |
| Streicher und Sandkühler | Klinische Zytologie. Stuttgart, Thieme (1953). |

- | | |
|--------------|---|
| Strugger, S. | Fluoreszenzmikroskopie und
Mikrobiologie.
Hannover, Schaper (1949). |
| Weiss | cit. n. Zinser. |
| Zeiger, K.Z. | Zellforsch. 22, 607 (1935);
23, 433 (1936); 24, 11 (1936);
34 (1949). |
| Zinser, H.K. | Die Zytodiagnostik in der Gynäko-
logie.
Jena, G. Fischer (1951). |

Lebenslauf.

Als Sohn des damaligen Assistenzarztes am Städtischen Krankenhaus, Dr. Wilhelm Hickl und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Müller, wurde ich, Ernst-Joachim Friedrich H i c k l , am 18.1.1931 in Nürnberg geboren.

1937 bis 1939 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart, wohin meine Eltern mittlerweile verzogen waren, 1939 bis 1941 die zu Erlangen.

Nach bestandener Aufnahmeprüfung war ich bis 1942 Schüler des Eberhard-Ludwigs-Gymnasiums in Stuttgart. Nachdem wir dort ausgebombt worden waren, kam ich wieder nach Erlangen an das Humanistische Gymnasium, wo ich im Juni 1949 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1949/50 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen. Das Physikum legte ich im April 1952 mit dem Gesamturteil "gut" ab.

Nach klinischem Studium in Erlangen, München und Freiburg unterzog ich mich dem medizinischen Staatsexamen an der Universität Erlangen, das ich am 24.8.1955 mit dem Gesamturteil "sehr gut" abschloss.

Seit September 1955 bin ich als Pflichtassistent an der geburtshilflichen Abteilung der Universitäts-Frauenklinik zu Erlangen tätig.

